

N° d'ordre (INP) : 2395
(USJ) : 07.DC.05

THESE

Présentée pour obtenir les titres de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

Ecole doctorale Transferts, Dynamique des Fluides, Energétique et Procédés
Spécialité: Génie des procédés et de l'environnement

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE SAINT JOSEPH DE BEYROUTH

Ecole doctorale Sciences et Santé
Spécialité: Chimie

Par

Dalal JAWICH

**Etude de la toxicité de pesticides vis-à-vis de deux genres de levures :
approche cinétique et moléculaire**

Soutenue le 14 novembre 2006 devant le jury composé de :

M. P. Strehaiano : Directeur de thèse. Professeur INP-ENSIACET. Toulouse
M. R. Lteif : Directeur de thèse. Professeur Assistant Fac. des Sciences. USJ. Beyrouth
Mme A. Pfohl-Leszkowicz. Président. Professeur INP-ENSAT, Toulouse
Mme D. Karam-Sarkis. Rapporteur. Professeur Fac. de Pharmacie. USJ. Beyrouth
M. S. Roussos. Rapporteur. Directeur de Recherche IRD. Marseille
M. C. Hilan. Examineur. Directeur de Recherche IRAL. Beyrouth

REMERCIEMENTS

Je voudrais adresser mes sincères remerciements et ma gratitude la plus profonde à tous ceux qui ont aidé à l'accomplissement de cette thèse. Parmi eux je remercie chaleureusement le Pr Pierre Strehaiano, mon directeur de thèse, de m'avoir reçue au sein de son équipe, de la confiance qu'il m'a accordée, et de son soutien scientifique et moral tout au long du travail ; merci d'avoir cru en moi, et en mon travail.

Je remercie le Pr Annie Leszkowicz d'avoir accepté de participer à cette thèse et de m'avoir accueillie dans son laboratoire et conseillée dans la réalisation de mes travaux d'adduits à l'ADN.

Je remercie également l'administration de la faculté des sciences de l'Université Saint Joseph, en particulier, le Pr Ragi Abou Chacra, doyen précédent de la faculté, d'avoir bien voulu prêter intérêt à cette thèse et accepter le projet, et le Pr Toufic Rizk, doyen actuel, pour sa collaboration. Je tiens à dire un grand merci au Dr Roger Lteif, aussi mon encadreur, de m'avoir accueillie dans les laboratoires de la faculté et conseillée dans la réalisation de mon travail de doctorat.

Merci également au Dr Michel Afram, Président et Directeur général de l'Institut de Recherche Agronomique Libanais (IRAL), qui a accordé l'autorisation pour le déroulement de ce projet en parallèle avec ma fonction à l'IRAL. Merci aussi au Dr Christo Hilan, directeur du laboratoire de Fanar à l'IRAL, pour son dévouement pour mon travail scientifique tout en me laissant une grande liberté.

J'exprime aussi ma gratitude au Pr Rachad Saliba, qui a sacrifié de son temps pour répondre à mes questions nombreuses et me guider alors que ce projet ne faisait que commencer.

J'adresse mes remerciements au Pr Dolla Karam-Sarkis et au Pr Sevastianos Roussos qui ont accepté de juger ce travail et d'en être rapporteurs.

Un merci spécial pour mes collègues et amis à l'IRAL qui ont contribué par leur soutien et amitié, chacun à sa façon, à la progression de mon travail, merci Lina, Jocelyne, Rima, Roula, Rafic, Imad, Michel, Wahib, Nazik, et Georges. Rima merci d'être toujours disponible et de m'avoir accompagnée pendant toutes les étapes de ce travail avec toute l'attention et l'amitié, trouvant toujours les mots qu'il faut quand ça ne va pas.

Je remercie également les membres du laboratoire de toxicologie et sécurité alimentaire de l'ENSAT pour leur sympathie et leur aide sur le plan scientifique et humain : Mariana, Virginie, Julien, Delphine, Mira, Sonia, Josianne, Jelena et Jovica, on a passé ensemble des moments inoubliables. Virginie merci pour ton aide scientifique précieuse et ton accueil chaleureux lors de mon premier séjour à Toulouse et de mes premières manip de postmarquage. Je n'oublierai pas aussi de remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées à l'ENSAT au cours de cette étude, et les personnes que j'ai connues à l'ENSIACET lors des cultures fermentaires que j'ai travaillées dans leur laboratoire à Basso Cambo, merci pour l'aide que vous m'avez apportée et les moments agréables passés ensemble.

Un merci du fond du cœur à ma famille qui est toujours à mes côtés, mes parents qui suivent mon travail de près avec affection et respect, soucieux des plus petits détails ; Chadi qui m'a encouragée à me lancer dans ce projet, m'a financé mon premier séjour à Toulouse et m'a soutenue pendant les moments difficiles surtout les périodes critiques que traverse notre cher Liban ; Wassim qui a passé avec moi les nuits interminables de cultures cellulaires dans les laboratoires de l'Université Saint Joseph et qui a facilité les week-ends de travail par son humour particulier ; et Joseph qui apprécie toujours mon travail et m'écoute avec amitié, patience et attention infinies. J'ai vraiment de la chance d'être aussi bien entourée.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	12
CHAPITRE I	
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
1. Les adduits à l'ADN.....	14
1.1. Notion d'adduit à l'ADN.....	14
1.2. Biomarqueur de génotoxicité.....	14
1.3. Signification et effets biologiques des adduits à l'ADN.....	15
1.3.1. Adduits stables et adduits dépurinants.....	15
1.3.2. Les lésions de l'ADN.....	16
1.3.3. Relation entre adduit et mutation.....	17
1.4. Réparation de l'ADN.....	17
1.4.1. La réparation directe.....	18
1.4.2. La réparation par excision.....	18
1.4.2.1. La réparation par excision de base.....	18
1.4.2.2. La réparation par excision de nucléotide.....	18
1.5. Méthode de postmarquage de l'ADN au ³² P.....	20
1.5.1. Principe et développement de la méthode.....	20
1.5.2. Avantages et inconvénients de la méthode.....	20
2. Les levures.....	22
2.1. Le cycle de croissance.....	23
2.2. La physiologie des levures.....	23
2.2.1. Besoins nutritifs.....	23
2.2.2. Conditions physicochimiques.....	25
2.2.3. Régulation respiration – fermentation.....	25
2.3. Bioconversions et réactions de défense.....	26
2.4. Génétique moléculaire des levures.....	29
2.4.1. Organisation du génome.....	29
2.4.2. Le cycle mitotique de division cellulaire.....	30
2.4.3. Réparation génétique.....	30
2.5. <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	31
2.6. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
3. Les pesticides.....	33
3.1. Classification.....	33
3.2. Résidus et indices toxicologiques.....	33
3.2.1. Limite maximale de résidus (LMR).....	34
3.2.2. Dose journalière admise (DJA).....	34
3.3. Résidus de pesticides dans les denrées alimentaires.....	35
3.4. Toxicité et génotoxicité.....	37

3.5. Interaction pesticides – levures.....	40
3.5.1. Cytotoxicité et génotoxicité.....	40
3.5.2. Bioaccumulation et dégradation.....	43

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES.....46

1. Matériel chimique.....47

2. Matériel biologique.....47

3. Test de toxicité.....48

4. Etude préliminaire de toxicité.....48

4.1. Cultures.....48

4.2. Analyse des sucres.....49

4.3. Analyse de l'éthanol.....49

4.4. Analyse des résidus de pesticide.....49

4.4.1. Préparation de l'échantillon et procédure d'extraction.....49

4.4.2. Dosage des résidus.....50

5. Etude de cytotoxicité et génotoxicité.....50

5.1. Cultures.....50

5.1.1. Cultures fermentaires.....50

5.1.2. Essai en respiratoire.....51

5.2. Evaluation de la biomasse levurienne.....51

5.2.1. Méthode de numération/viabilité.....52

5.2.2. Méthode de la densité optique.....53

5.3. Analyse des adduits à l'ADN par la méthode du postmarquage au phosphore 32.....53

5.3.1. Produits utilisés.....53

5.3.1.1. Les produits chimiques.....53

5.3.1.2. Les enzymes.....53

5.3.1.3. Matériel de chromatographie.....53

5.3.1.4. Les adduits standards.....54

5.3.2. Principe.....55

5.3.3. Mise en place de points de contrôle.....57

5.3.3.1. Pureté de l'ADN.....57

5.3.3.2. Pureté et hydrolyse de l'ADN.....57

5.3.3.3. Enrichissement à la nucléase P1.....57

5.3.3.4. Marquage par la T4 polynucléotide kinase.....57

5.3.3.5. Contrôle des dépôts en D1.....57

5.3.4. Extraction et purification de l'ADN.....59

5.3.5. Estimation de la qualité et de la quantité de l'ADN.....59

5.3.6. Marquage des adduits.....60

5.3.6.1. Hydrolyse de l'ADN.....60

5.3.6.2. "Enrichissement" à la nucléase P1.....60

5.3.6.3. Marquage des adduits au ³²P en position 5'.....60

5.3.6.4. Test d'efficacité de l'hydrolyse : marquage des nucléotides normaux.....	60
5.3.6.5. Test d'efficacité de "l'enrichissement" par la nucléase P1.....	61
5.3.6.6. Séparation des adduits par chromatographies bidimensionnelles sur couche mince de polyéthylèneimine cellulose.....	61
5.3.7. Autoradiographie et quantification des adduits.....	63
6. Calcul des paramètres cinétiques.....	64
RESULTATS.....	66
CHAPITRE III	
TOXICITE DES PESTICIDES.....	67
1. Etude préliminaire de toxicité.....	68
2. Etude de cytotoxicité et génotoxicité.....	77
2.1. Cytotoxicité et mise en évidence d'adduits à l'ADN chez <i>M. pulcherrima</i>	77
2.1.1. Exposition des deux levures au penconazole dès l'inoculation.....	78
2.1.2. Exposition de <i>M. pulcherrima</i> au penconazole au cours de sa croissance.....	78
2.1.3. Exposition de <i>S. cerevisiae</i> au penconazole au cours de sa croissance.....	84
2.1.4. Discussion.....	84
2.2. Génotoxicité du penconazole.....	86
2.2.1. Détection et dosage des adduits à l'ADN chez les deux levures.....	86
2.2.2. Discussion.....	87
3. Synthèse et discussion sur les études de toxicités des pesticides.....	90
CHAPITRE IV	
VALIDATION DU MODELE CELLULAIRE.....	92
1. Introduction.....	93
2. Matériel et méthodes.....	93
3. Résultats.....	94
3.1. Cultures fermentaires.....	94
3.1.1. Cinétiques de croissance.....	94
3.1.1.1. Exposition au toxique à t = 0.....	94
3.1.1.2. Exposition au toxique à t = 4 h.....	95
3.1.2. Etude moléculaire.....	96
3.1.2.1. Test au Benzo(a)pyrène.....	96
3.1.2.2. Test à l'aflatoxine B ₁	102
3.2. Essai en respiratoire.....	103
4. Discussion et conclusion.....	104

CHAPITRE V

DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	108
---	------------

CHAPITRE VI

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	112
---	------------

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Sites potentiels de la formation d'adduits à l'ADN (La & Swenberg, 1996).....	15
Figure 2 : Formation d'adduits à l'ADN stables et d'adduits dépurinants et génération de sites apuriniques (Cavalieri et Rogan, 2002).....	16
Figure 3 : Nucleotide excision repair (Bedard et Massey, 2006).....	19
Figure 4 : Métabolisme du benzo(a)pyrène chez les mycètes (a) et formation du BPDE par <i>Cunninghamella elegans</i> (b) (Cerniglia, 1984 ; Sutherland 1992).....	27
Figure 5 : Métabolisme de l'aflatoxine B ₁ (Bedard et Massey, 2006).....	28
Figure 6 : Les structures proposées des complexes de transition CYP-lanostérol (a) et CYP-triazole (b) (Buchenauer, 1987).....	29
Figure 7 : Comptage sur cellule de Thoma.....	52
Figure 8 : Comparaison du post-marquage de l'adduit standard B(a)P sur deux types de plaques de PEI cellulose.....	54
Figure 9 : Principe de la méthode du post-marquage au ³² P.....	56
Figure 10 : Schéma des différents points de contrôle réalisés lors du déroulement du postmarquage.....	58
Figure 11 : Chromatographies successives pour la purification et la séparation des adduits sur les plaques de PEI cellulose.....	62
Figure 12 : Régressions linéaires des CPM moyens détectés par le bioimager en fonction des DPM estimés attendus.....	64
Figure 13 : Effet du penconazole (10 LMR) en addition durant la croissance de <i>S. cerevisiae</i> , après 4 h, 12 h, et 24 h de l'inoculation.....	84
Figure 14 : Effet du penconazole (10 LMR) en apport au temps 4 h de la croissance sur la formation d'adduits à l'ADN chez <i>S. cerevisiae</i> et <i>M. pulcherrima</i> après plusieurs temps de contact avec le pesticide a) 4 h, b) 8 h, c) 12 h, d) 16 h, e) témoin exempté de pesticide et f) Représentation schématique.....	87
Figure 15 : Effet du B(a)P et de l'aflatoxine B ₁ (0,2 et 2 ppm) en apport avant l'inoculation sur les cinétiques de croissance de (a) <i>M. pulcherrima</i> et (b) <i>S. cerevisiae</i>	94
Figure 16 : Effet du B(a)P et de l'aflatoxine B ₁ (0,2 et 2 ppm) en apport après 4 h de l'inoculation sur les cinétiques de croissance de (a) <i>M. pulcherrima</i> et (b) <i>S. cerevisiae</i>	95

Figure 17 : Formation d'adduits à l'ADN chez <i>M. pulcherrima</i> suite à l'addition du B(a)P avant l'inoculation suivant les deux doses 0,2 et 2 ppm, après les temps de contact a) 3 h, b) 6 h, c) 9 h, d)12 h, e) témoin sans traitement, et f) Représentation schématique.....	97
Figure 18 : Formation d'adduits à l'ADN chez <i>M. pulcherrima</i> suite à l'addition du B(a)P avant l'inoculation suivant les deux doses 0,2 et 2 ppm, après les temps de contact a) 3 h, b) 6 h, c) 9 h, d)12 h et e) témoin sans traitement.....	98
Figure 19 : Formation d'adduits à l'ADN chez <i>S. cerevisiae</i> suite à l'addition du B(a)P avant l'inoculation suivant les deux doses 2 et 0,2 ppm, après les temps de contact a) 3 h, b) 6 h, c) 9 h, d)12 h, e) témoin sans traitement	99
Figure 20 : Formation d'adduits à l'ADN chez <i>S. cerevisiae</i> suite à l'addition du B(a)P après quatre heures de l'inoculation suivant les deux doses 2 et 0,2 ppm, après les temps de contact a) 3 h, b) 6 h, c) 9 h, et d)12 h, e) témoin sans traitement.....	100
Figure 21 : Formation d'adduits à l'ADN chez <i>M. pulcherrima</i> sous l'effet de l'Aflatoxine B ₁ (2 ppm) additionnée après quatre heures l'inoculation, après les temps de contact a) 3 h, b) 6 h, c) 9 h, d) 12 h, e) témoin sans aflatoxine, et f) Représentation schématique.....	102
Figure 22 : Effet de l'apport de 0,2 ppm d'Aflatoxine B ₁ avant l'inoculation sur la formation d'adduits à l'ADN chez <i>S. cerevisiae</i> après plusieurs temps de contact a) 3 h ; b) 6 h ; c) 9 h, et d) 12 h et e) témoin sans aflatoxine.....	103
Figure 23 : Formation d'adduits à l'ADN chez <i>S. cerevisiae</i> (en métabolisme respiratoire) exposée a 0,2 ppm de B(a)P après quatre heures de l'inoculation après les temps de contact a) ½ h, b) 1 h, c) 1 h ½ , d) 2 h, e) témoin non traité, et f) Représentation schématique.....	103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Méthodes qui peuvent être utilisées pour détecter les adduits à l'ADN (Faucet-Marquis, 2005).....	21
Tableau 2: Caractéristiques des pesticides testés (FAO/OMS, 1994; Geahchan et Abi Zeid Daou, 1995).....	47
Tableau 3 : Composition du milieu de culture et de la solution d'alimentation.....	51
Tableau 4: Nombre total d'adduits/10 ⁹ nucléotides aux différents temps de contact pour les deux levures suite au traitement par le penconazole (10 LMR) après quatre heures de l'inoculation.....	87
Tableau 5 : La biomasse finale produite et la vitesse de croissance moyenne des deux levures obtenues suite à l'exposition à 0,2 et 2 ppm d'AFB ₁ et de B (a)P dès l'inoculation.....	95
Tableau 6 : La biomasse finale produite et la vitesse de croissance moyenne des deux levures obtenues suite à l'exposition à 0,2 et 2 ppm d'AFB ₁ et de B (a)P après 4 h de l'inoculation.....	96
Tableau 7: Nombre total d'adduits à l'ADN (Nombre d'adduits/10 ⁹ nucléotides) obtenus aux différents temps de contact avec <i>M. pulcherrima</i> suite au traitement par le B(a)P (2 et 0,2 ppm) avant l'inoculation.....	97
Tableau 8 : Nombre total d'adduits à l'ADN (Nombre d'adduits/10 ⁹ nucléotides) obtenus aux différents temps de contact chez <i>M. pulcherrima</i> suite au traitement par le B(a)P (2 et 0,2 ppm) après quatre heures de l'inoculation.....	98
Tableau 9: Nombre total d'adduits à l'ADN (Nombre d'adduits/10 ⁹ nucléotides) obtenus aux différents temps de contact avec <i>S. cerevisiae</i> suite au traitement par le B(a)P (2 et 0,2 ppm) avant l'inoculation.....	99
Tableau 10 : Nombre total d'adduits à l'ADN (Nombre d'adduits/10 ⁹ nucléotides) obtenus aux différents temps de contact avec <i>S. cerevisiae</i> suite au traitement par le B(a)P (2 et 0,2 ppm) après quatre heures de l'inoculation.....	100
Tableau 11: Nombre total d'adduits à l'ADN (nombre d'adduits/10 ⁹ nucléotides) obtenus après les différents traitements des deux levures par le B(a)P, et ceci pour différents temps de contact (3, 6, 9 et 12 h).....	101
Tableau 12: Nombre total d'adduits à l'ADN (Nombre d'adduits/10 ⁹ nucléotides) obtenus aux différents temps de contact chez <i>M. pulcherrima</i> suite au traitement par l'Aflatoxine B ₁ (2 ppm) après quatre heures de l'inoculation.....	102
Tableau 13: Nombre total d'adduits à l'ADN (Nombre d'adduits/10 ⁹ nucléotides) obtenus aux différents temps de contact chez <i>S. cerevisiae</i> (en métabolisme respiratoire) suite au traitement par le B(a)P (0,2 ppm) après quatre heures de l'inoculation.....	104

LISTE DES ABREVIATIONS

³² P	Phosphore 32
8-OH-dG	8-hydroxy-2'-déoxyguanosine
3'-dGMP	3'-monophosphate déoxyguanosine
3-AT	3-amino-1,2,4-triazole
2,4-D	2,4-dichloro acide phénoxyacétique
AC-MS	Spectrométrie de masse à accélérateur de particules
ADN	Acide désoxyribonucléique (= DNA)
AFB ₁	Aflatoxine B ₁
AFB ₁ -FAPY	AFB ₁ -formamidopyrimidine
AFB ₁ -N ⁷ -Gua	AFB ₁ -N ⁷ -Guanine
AP	Apurinique/Apyrimidique
ARN	Acide ribonucléique (= RNA)
ATP	Adénosine triphosphate
B(a)P	Benzo(a)pyrène
BER	Réparation par excision de base
BPA	Bonnes pratiques agricoles
BPDE	Benzopyrène diol époxyde
IARC	Centre international de recherche contre le cancer (= CIRC)
CDEPA	2-chloro-N-(2,6-diéthylphényl)acétamide
CHRL	Perte de chromosome
CL ₅₀	Concentration létale 50
CPG	Chromatographie en phase gazeuse (= GC)
CPM	Coups par minute
CS ₂	Sulfure de carbone
CYP	Cytochrome P450
DDE	1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophényl)éthylène
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DEA	Diétylaniline
DJA	Dose journalière admise
DL ₅₀	Dose létale 50
DPM	Désintégrations par minute
DSE	Dose sans effet
DTT	Dithiothréitol
EBI	Ergosterol biosynthesis inhibitors
ECD	Détecteur par capture d'électrons
EPA	Environmental protection agency
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FDA	Food and drug administration
GGR	Global genome repair
HAP	Hydrocarbures polycycliques aromatiques
HCH	Hexachlorohéxane
HPLC	Chromatographie liquide de haute performance
IC ₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
LMR	Limite maximale de résidus
LC-MS	Chromatographie liquide - spectrométrie de masse
MCPA	2-méthyle-4-chloro acide phénoxyacétique
MDA	Malathion diacide

MMA	Malathion monoacide
MMR	Réparation de mauvais appariements
MN	Nucléase micrococcocal de staphylocoque
MS	Spectrométrie de masse
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme réduite
NER	Réparation par excision de nucléotide
ND	Non déterminé
NPD	Nitrogen and phosphorus detector
NP1	Nucléase P1
OMS	Organisation mondiale de la santé
OP	Organophosphoré
OPP	Office of pesticide programs
PCP	Pentachlorophénol
PEI	Polyéthylène imine
Poly dG	Polydéoxyguanosine
Poly dT	Polydéoxythymidine
RAL	Relative adduct level
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SPD	Phosphodiesterase de rate
TCR	Transcription-coupled repair
T _{1/2}	Temps de demie vie
TLS	Translesion bypass synthesis
UFC	Unités formant des colonies
YPD	Yeast peptone dextrose
YPDA	Yeast peptone dextrose agar

Le contrôle chimique des produits alimentaires a entraîné une augmentation spectaculaire du rendement des denrées majeures faisant partie du régime alimentaire, contribuant ainsi à l'amélioration de la santé publique ; ce traitement par les pesticides est jusqu'à présent le moyen de protection prépondérant. Cependant, les pesticides peuvent aussi être très nocifs, ils peuvent endommager l'environnement et s'accumuler dans les écosystèmes ; comme ils possèdent le potentiel de causer toute une gamme d'effets toxiques envers la santé humaine, dépendamment de la dose appliquée, parmi lesquels le cancer, les dysfonctions des systèmes reproductifs, des systèmes endocriniens et immunitaires, l'atteinte aiguë et chronique du système nerveux et l'endommagement des poumons.

Le régime alimentaire est une source importante d'exposition aux pesticides et à leurs traces très dangereuses présentes dans les denrées. Afin de minimiser l'exposition humaine aux résidus de pesticides, des contrôles réglementaires concernant leur utilisation et le niveau de leurs résidus ont été établis. Mais malgré la conscience publique du risque provenant de cette exposition et les divers incidents alarmants cités, et quoi qu'il en soit, ces produits phytosanitaires resteront, dans le cadre d'une politique productiviste et à des fins et des volontés exportatrices, une des composantes essentielles de la production alimentaire. En effet, leur utilisation est toujours en croissance et de nouvelles matières actives sont continuellement et fréquemment introduites sur le marché ; les contrôles très récents indiquent une présence permanente et préoccupante de résidus et multirésidus contaminant les denrées diverses. Par conséquent l'examen de ces résidus et de leurs effets demeure une nécessité, surtout que pour de nombreux pesticides, l'ADN est la cible primordiale. Bien que dotés d'actions hautement spécifiques, certains pesticides sont capables d'interagir avec les structures cellulaires directement ou après transformation par les enzymes du métabolisme, et de former une liaison covalente avec les bases de l'ADN donnant des adduits à l'ADN, biomarqueurs de génotoxicité. Divers systèmes expérimentaux ont servi à élucider les mécanismes d'action des pesticides, mais depuis quelque temps l'expérimentation toxicologique et les études de toxicités diverses dépendent de plus en plus des modèles cellulaires et des microorganismes. Les caractéristiques cellulaires et moléculaires exceptionnelles du modèle levurien lui fournissent des avantages uniques pour l'exécution de tout plan expérimental et l'interprétation des résultats ; les levures sont désormais un matériel expérimental indispensable pour la recherche scientifique.

Le but général de cette thèse était d'étudier les toxicités de certains pesticides couramment utilisés pour le traitement phytosanitaire des denrées alimentaires, à l'aide d'un système expérimental levurien, *Saccharomyces cerevisiae* eucaryote modèle et *Metschnikowia Pulcherrima* de type métabolique opposé, et de confirmer la validité de ce modèle expérimental dans le contexte toxicologique. Pour cela, notre travail a porté, dans un premier temps, sur la recherche de la toxicité de six matières actives et l'identification du mécanisme d'action du penconazole en étudiant sa cytotoxicité globale et sa génotoxicité en termes d'adduits à l'ADN par la technique de postmarquage de l'ADN au phosphore 32. Dans un second temps, nous avons testé notre système levurien vis-à-vis de l'aflatoxine B₁ et le benzo(a)pyrène, deux génotoxiques de référence, aussi par une recherche de la cytotoxicité globale et la formation d'adduits à l'ADN.

Le premier chapitre de ce manuscrit est constitué d'une recherche bibliographique qui commence par la génotoxicité et les adduits à l'ADN, se poursuit par une analyse du système levurien dans ses aspects physiologiques, métaboliques, génétiques et techniques, ensuite une revue concernant les pesticides, l'état actuel de leurs résidus et les études de leurs toxicité et génotoxicité, et pour terminer cette recherche, nous avons abordé les interactions pesticides-levures. Le deuxième chapitre présente les moyens mis en œuvre pour répondre aux objectifs énoncés ci-dessus. La troisième partie est répartie sur trois chapitres, elle présente l'approche expérimentale suivie, les résultats obtenus, et la conclusion générale de ce travail.

L'ensemble de cette étude permet de mettre en évidence le risque sanitaire lié aux résidus de pesticides, et l'importance du système expérimental levurien pour la définition de leurs toxicités.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les adduits à l'ADN

L'exposition à des agents potentiellement toxiques, par l'intermédiaire de l'alimentation et l'environnement, apparaît à l'heure actuelle inévitable, compte tenu de l'accroissement de la démographie mondiale et de son urbanisation. Les êtres vivants se trouvent donc continuellement exposés à une variété de substances chimiques exogènes présentant souvent une forte réactivité et pouvant provoquer des effets biologiques délétères. L'effet d'un toxique sur un organisme dépend essentiellement, à part la quantité de ce toxique, des substances réactionnelles qu'il engendre. La détermination du mécanisme d'action d'un toxique constitue donc une étape principale dans l'étude de toxicité ; car seule la connaissance du mécanisme d'action d'un toxique permet de définir de manière rationnelle les concentrations admissibles pour une exposition donnée, et développer les tests biochimiques ou physiologiques capables de détecter précocement l'action toxique.

1.1. Notion d'adduit à l'ADN

Le processus de genèse des effets biologiques commence par l'exposition au toxique, ensuite son absorption, sa métabolisation pour en faciliter son excrétion, et la possibilité de sa réactivité ultime avec les structures biologiques. Le métabolisme joue donc un rôle important qui peut être bénéfique si le toxique est éliminé, ou nuisible lors de l'activation des xénobiotiques en substances électrophiles pouvant réagir avec les groupements nucléophiles des macromolécules biologiques tels que les protéines, les lipides ou les acides nucléiques. Un nucléotide ayant fixé de manière covalente un xénobiotique ou son métabolite, constitue un adduit à l'ADN (Pfohl-Leszkowicz, 1994a ; Guengerich, 2001 ; Wogan *et al*, 2004 ; Jeffrey and Williams, 2005).

Parmi les sites nucléophiles de l'ADN, les atomes d'azote (N), d'oxygène (O), et de carbone (C) des bases pyrimidiques (thymine, cytosine) et puriques (adénine ou guanine), constituent les sites privilégiés des composés génotoxiques ; il existe donc 18 sites potentiels impliqués dans la formation d'adduits (figure 1) (La et Swenberg, 1996 ; Faucet-Marquis ; 2005). Le site d'attaque préférentiel des cancérigènes génotoxiques est la guanine, l'azote en 7 est modifié par l'aflatoxine B₁ et les hydrocarbures aromatiques polycycliques se fixent sur le carbone en 8 ou l'azote en 2 (Pfohl-Leszkowicz, 1994a).

1.2. Biomarqueur de génotoxicité

La modification de l'ADN par les substances chimiques est considérée comme un événement marqueur de leur génotoxicité, et la détection des adduits à l'ADN constitue une bonne méthode pour déterminer la dose de molécule réactive ayant effectivement atteint une cellule. Cet effet toxique sur une cible critique constitue un biomarqueur d'effet précoce, alors que les biomarqueurs d'exposition représentent la mesure du xénobiotique ou de ses métabolites dans l'organisme vivant ou l'environnement. En effet, les mesures externes ou internes des polluants et toxiques renseignent quant à l'exposition mais ne fournissent pas une preuve des dégâts toxicologiques ; il n'y a pas de liaison directe entre ces données et la probabilité de la transformation du toxique en génotoxique ultime. Le développement des techniques de la biologie moléculaire a révolutionné la recherche toxicologique en introduisant les biomarqueurs d'effets, tel que les adduits à l'ADN, qui constituent actuellement une partie principale de l'évaluation du risque à côté des biomarqueurs d'exposition (Pfohl-Leszkowicz, 1994a ; Hemminki, 1995 ; Vainio, 1998, 2001 ; Shuker, 2002 ; Martin *et al*, 2005). L'utilisation des adduits à l'ADN comme biomarqueur de pollution par des génotoxiques chimiques présente un vaste champ d'application, citons la mise en évidence de la formation d'adduits à l'ADN chez le poisson et la moule lors du suivi de pollution de la marée noire de l'Erika

(Amat-Bronnert, 2004), la détection des adduits à l'ADN en tant que biomarqueurs d'effets des résidus de pesticides, ceci dans le placenta de femmes résidant à proximité de rivières polluées par des pesticides organochlorés (Lagueux *et al*, 1999), et l'analyse des adduits à l'ADN dans les lymphocytes de personnes travaillant dans des zones à haute densité de circulation automobile, et chez les personnes travaillant dans les cokeries, comme biomarqueur d'intoxication par les HAP (Yang *et al*, 1996 ; Mensing *et al*, 2005).

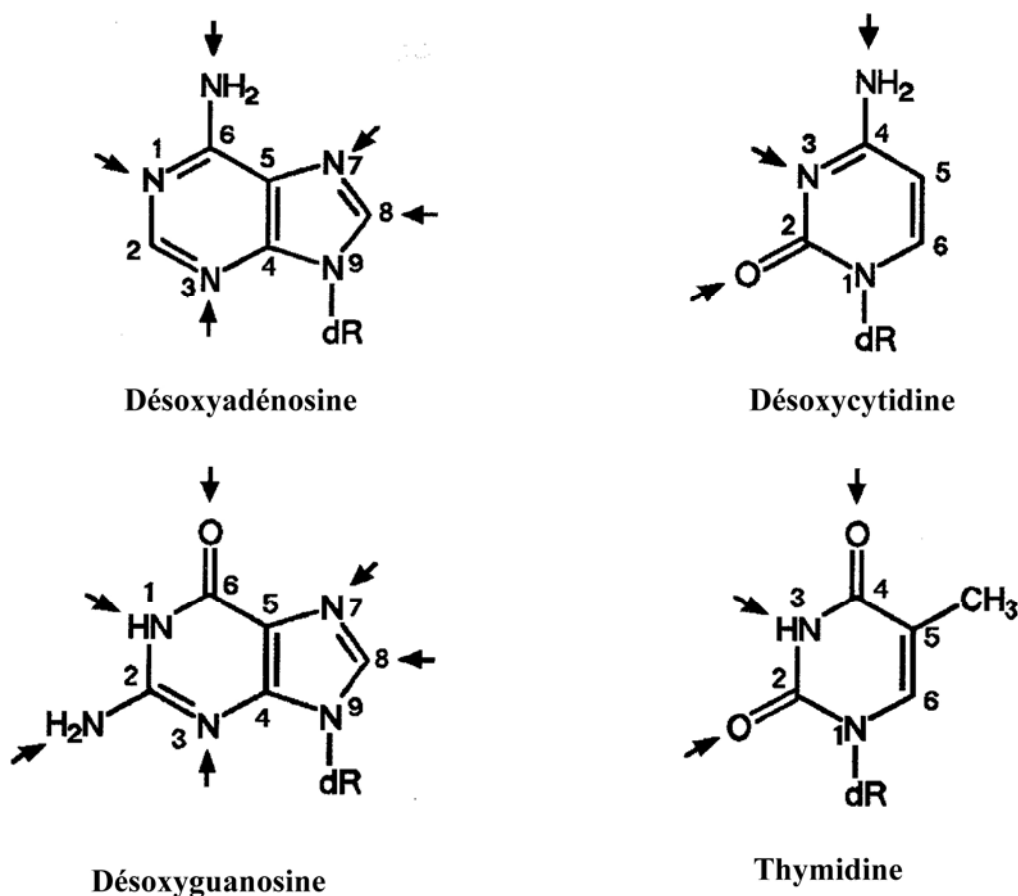


Figure 1: Sites potentiels de la formation d'adduits à l'ADN (La & Swenberg, 1996 ; Faucet-Marquis ; 2005)

1.3. Signification et effets biologiques des adduits à l'ADN

Les adduits ont le potentiel de produire des effets biologiques néfastes lors de la réplication de l'ADN et plus tard lors de sa traduction. Si les adduits ne sont pas ou sont mal éliminés par les systèmes de réparation cellulaires, l'information génétique sera modifiée par recombinaisons ou mutations.

1.3.1. Adduits stables et adduits dépurinants

Les cancérigènes chimiques se lient à l'ADN pour former deux types d'adduits, les adduits stables qui restent fixés à l'ADN à moins d'être pris en charge par les systèmes de réparation de l'ADN, et les adduits dépurinants qui sont relâchés par déstabilisation de la liaison glycosyl (figure 2). Les adduits stables sont formés sur les positions N6 de l'adénine ou N2 de la guanine, tandis que les adduits dépurinants sont obtenus par les liaisons avec les positions N3 ou N7 de l'adénine et N7 et parfois C8 de la guanine. La perte de l'adénine ou de la guanine par dépurination mène à la

formation de sites apurinique ou abasiques qui peuvent générer des mutations ; ainsi que les erreurs produites lors de leur réparation (Cavalieri et Rogan, 1992, 1998 ; Faucet-Marquis, 2005).

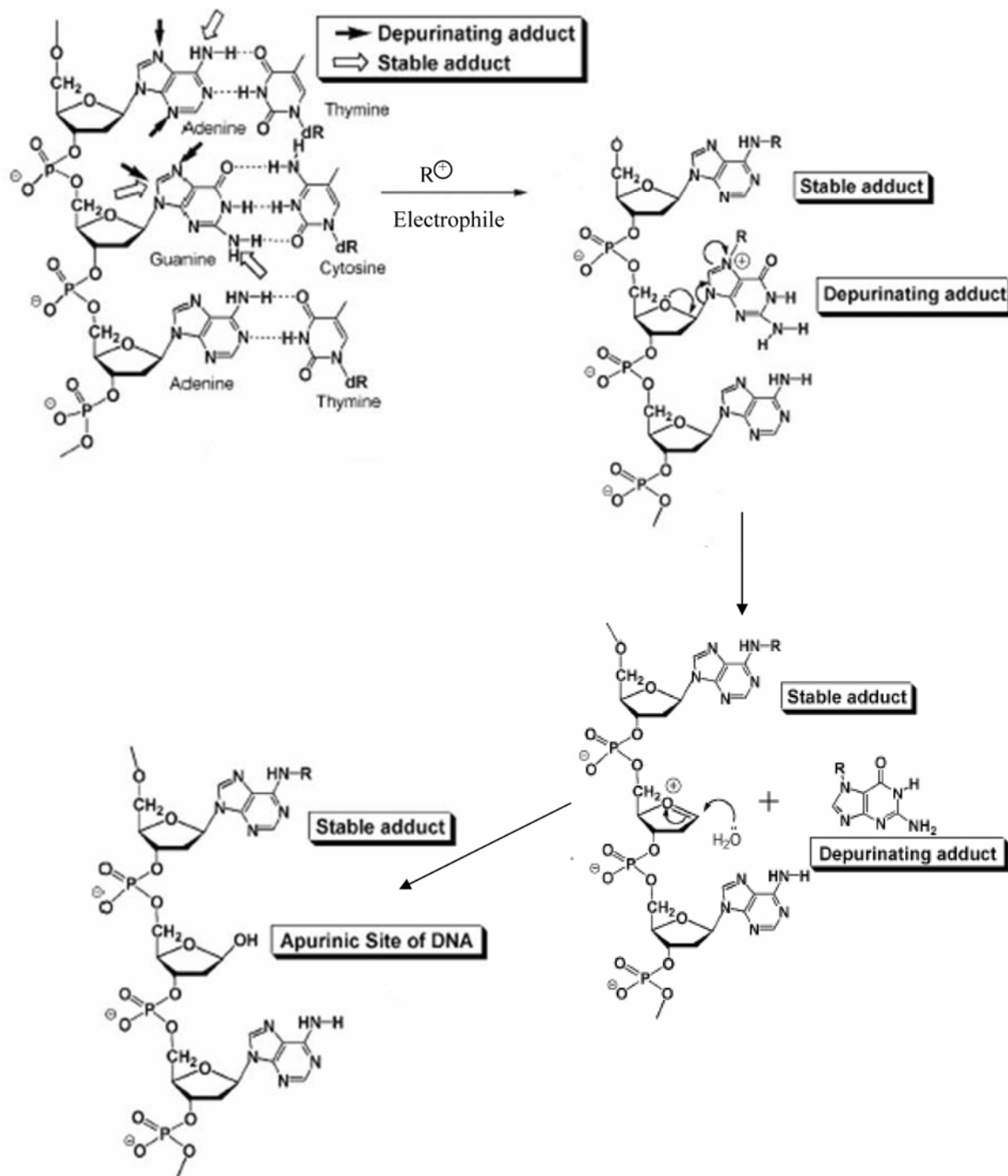


Figure 2: Formation d'adduits à l'ADN stables et d'adduits dépurinants et génération de sites apuriniques (Cavalieri et Rogan, 2002 ; Faucet-Marquis ; 2005)

1.3.2. Les lésions de l'ADN

Les lésions persistantes sur l'ADN, malgré l'activité de réparation des dégâts afin de prévenir l'altération de l'information génétique, conduisent à différents types de mutations (Pfohl-Leszkowicz, 1994b).

Les macrolésions

Effet visible cytologiquement au niveau des chromosomes, avec changement soit du nombre de chromosomes comme l'aneuploïdie ou la polyploïdie, soit de la structure du chromosome par échange de segments entre chromatides sœurs, ou translocation, ou délétion de fragments de chromosome avec formation de micronoyaux.

Les microlésions

Effet non visible cytologiquement, se produisant au niveau des nucléotides. Il peut s'agir soit de changement qualitatif (substitution de paires de bases), il y a alors transition lorsqu'une purine est remplacée par une purine et la pyrimidine par une pyrimidine, et substitution quand la purine est remplacée par une pyrimidine ou l'inverse ; soit quantitatif c'est-à-dire perte ou ajout d'un nucléotide provoquant un décalage du cadre de lecture (frameshift mutation).

1.3.3. Relation entre adduit et mutation

Malgré l'efficacité des systèmes de réparation, un nombre non négligeable de lésions y échappent, interférant avec la réplication et la transcription. Pour empêcher la mort cellulaire résultant de l'arrêt de la réplication, un processus connu par TLS (*translesion bypass synthesis*) est mis en œuvre par les cellules. Le TLS permet le déroulement de la réplication malgré la lésion, ceci à l'aide d'une TLS DNA polymérase qui synthétise l'ADN en présence de la lésion, cependant avec une fidélité moindre que celle de la DNA polymérase, introduisant des mutations (Baynton *et al*, 1998 ; Guo *et al*, 2004 ; Bedard et Massey, 2006).

En effet, différents adduits à l'ADN peuvent induire des mutations, cependant, l'évènement mutationnel est assez complexe étant donné qu'un métabolite peut interagir avec différents sites de l'ADN et générer une variété d'adduits ; ces différents adduits peuvent donner un seul type de mutations, et inversement un seul adduit pourrait induire différents types de mutations. Il est donc souvent difficile d'établir un lien entre un adduit spécifique et un type de mutation, mais plutôt un « spectre mutationnel » pourrait être associé à un métabolite ou un adduit donné (Seo *et al*, 2000).

La mutagenicité des adduits à l'ADN est modelée par différents facteurs, certains sont structuraux tel que la conformation de l'adduit, et la séquence d'ADN qui contient l'adduit, aussi bien que les séquences éloignées, d'autres biologiques comme la nature de la polymérase impliquée (Kozack *et al*, 2000 ; Seo *et al*, 2000). Les mutations peuvent être formées à proximité de la lésion primaire, et pas nécessairement sur le site même de cette lésion (Garner, 1998).

Les sites apuriques provenant de certains adduits sont souvent accessibles à un TLS erroné, augmentant la fréquence des mutations ; ces mutations se forment uniquement sur le site même du dommage créé (Bedard et Massey, 2006).

Le benzopyrène diol époxyde (BPDE), métabolite réactif du benzopyrène, se fixe préférentiellement sur les sites GC et induit des transitions GC – TA, et pareillement, l'aflatoxine B₁ induit les transitions GC – TA (Kozack *et al*, 2000 ; Bigger *et al*, 2000 ; Keller-Seitz *et al*, 2004 ; Wogan *et al*, 2004).

1.4. Réparation de l'ADN

Les organismes possèdent nombreuses stratégies complexes qui fonctionnent dans le but commun de maintenir l'intégrité de leur matériel génétique. Tout un réseau de machinerie de réparation de l'ADN est dévoué à l'élimination des dommages causés par des sources endogènes ou exogènes. A part la réparation de mauvais appariement (mismatch repair ou MMR) qui corrige les erreurs introduites spontanément durant la réplication par la DNA polymérase, ces mécanismes

peuvent être divisés de point de vue biochimique, en réparation directe et indirecte (Sancar et Tang, 1993 ; Braithwaite *et al*, 1998 ; Prakash et Prakash, 2000 ; Hartwig et Schwerdtle, 2002 ; Bedard et Massey, 2006).

1.4.1. La réparation directe

La réparation directe représente en quelque sorte l'inversement du sens de la réaction causant la base modifiée ; l'élimination du groupe méthyle fixé en O⁶-méthylguanine par des DNA méthyltransférases en est le meilleur exemple.

1.4.2. La réparation par excision

Le deuxième type de réparation s'accomplit par élimination et remplacement de la base modifiée. Au cas où il y a excision de la base modifiée seulement, il s'agit de réparation par excision de base (BER) ; autrement, il y a élimination d'un oligonucléotide contenant la base modifiée, c'est alors la réparation par excision de nucléotides (NER). Dans les deux cas, le brin complémentaire servira de matrice pour combler la brèche générée.

1.4.2.1. La réparation par excision de base

La réparation BER est réalisée par clivage de la liaison glycosylique par une DNA glycolase qui doit reconnaître la lésion, ensuite incision du sucre AP (apurinique ou apyrimidique) par une endonucléase et resynthèse du nucléotide manquant par l'ADN polymérase β , et finalement une ADN ligase ressoude le brin. Une glycolase (il en existe plusieurs), enzyme clé dans ce mécanisme, reconnaît peu de lésions et est ATP-indépendante, ce qui fournit à ce système ses caractéristiques de haute spécificité et faible coût énergétique. De plus ce système ne nécessite la synthèse que d'un seul nucléotide.

BER prend en charge surtout les bases oxydées résultant d'un stress oxydatif, les sites AP induits par un agent chimique ou par l'action de glycolases, et les cycles imidazoles ouverts (formamidopyrimidine ou FAPY).

1.4.2.2. La réparation par excision de nucléotides

C'est un système hautement sophistiqué qui protège le génome des dommages majeurs induits par les facteurs environnementaux et provoquant une distorsion de l'ADN pouvant bloquer la réplication et la transcription (figure 3). Les adduits sont éliminés en oligonucléotides, et les blocs de réparation dépassent de loin ceux de BER, de même que le coût énergétique. Il s'effectue en plusieurs phases commençant par la reconnaissance de la lésion par le complexe XPC/HHR23B ensuite le facteur de liaison XPA, puis la démarcation et l'ouverture de la zone lésée par deux hélicases (XPB et XPD), suivie par la stabilisation de l'ADN ouvert par la protéine RPA (replication protein A) ensuite l'incision par des endonucléases (XPG et ERCC1/XPF), et à la fin, il y a élimination d'environ 28 nucléotides, resynthèse par DNA polymérase (δ et ϵ), et terminaison de la correction par l'ADN ligase I. Ce système requiert de l'ATP à plusieurs étapes, en plus des 4 ATPs dépensés pour resynthétiser chaque nucléotide ; ce gaspillage apparent est compensé par la non spécificité de l'excision : le même set de protéines est utilisé pour réparer pratiquement toutes les lésions, indépendamment de leur structure, incluant celles réparées habituellement par BER.

NER peut être divisé en deux sous-systèmes : réparation globale du génome (GGR) et réparation couplée à la transcription (TCR). La GGR est transcription-indépendante et balaie tout le génome à la recherche des lésions, elle élimine donc les lésions des domaines non transcrits du génome, ou des brins non transcrits appartenant à des gènes actifs. La TCR s'occupe spécifiquement

des lésions qui bloquent l'action de la RNA polymérase sur les brins transcrits des gènes actifs. Les étapes suivant la reconnaissance de la lésion sont identiques pour GGR et TCR.

Plus de 25 protéines participent à NER, ces composants individuels sont assemblés au site même de la lésion en une étape unique et suite à un seul événement de réparation, la machinerie entière NER est désassemblée à nouveau. De nombreux points restent à élucider parmi lesquels le mécanisme de reconnaissance des lésions, l'assemblage des protéines auprès de la lésion, l'accessibilité de l'ADN emballé par la chromatine, l'élimination de la RNA polymérase du site endommagé et sa coordination avec NER.

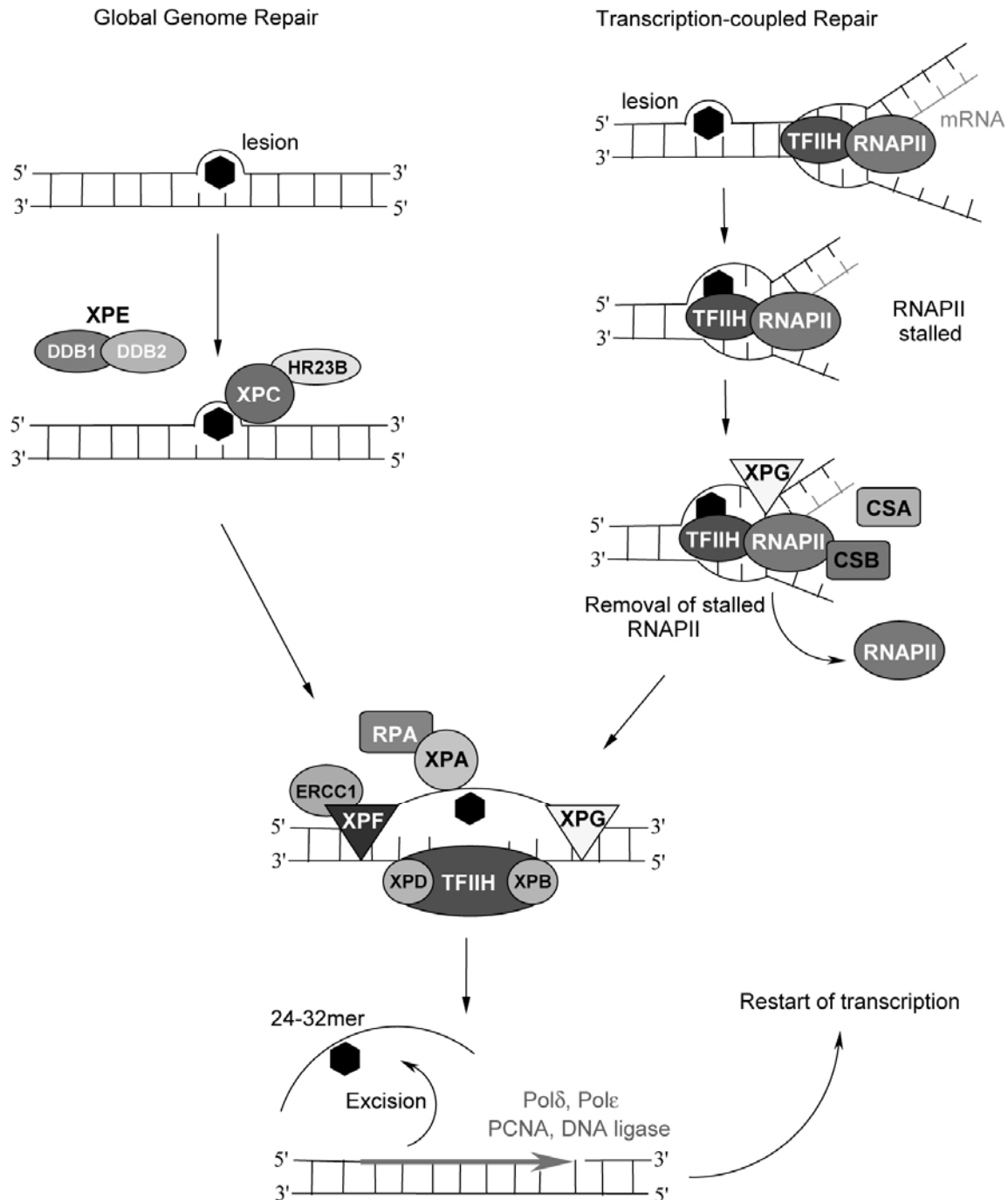


Figure 3: Nucleotide excision repair (Bedard et Massey, 2006)

1.5. Méthode de postmarquage de l'ADN au ^{32}P

Différentes méthodes ont été développées pour la détection et le dosage des adduits à l'ADN ; celles-ci incluant des méthodes physico-chimiques comme les techniques chromatographiques et le postmarquage au ^{32}P , et des méthodes biologiques tel que les techniques immunologiques (tableau 1). Parmi les méthodes les plus utilisées, le postmarquage de l'ADN est la méthode la plus sensible qui a été développée.

1.5.1. Principe et développement de la méthode

Les premières études correspondant aux analyses de postmarquage de l'ADN au ^{32}P ont été publiées en 1982 par Gupta *et al.* Ensuite, les publications se sont succédées dans lesquelles la méthode est employée pour la détection, la quantification et la caractérisation des adduits à l'ADN (Beach et Gupta, 1992 ; Talaska et Roh, 1992 ; Phillips et Castegnaro, 1993 ; Randerath et Randerath, 1994 ; Phillips, 1997). La procédure expérimentale consiste en quatre étapes : (1) une digestion enzymatique de l'ADN, (2) une présélection des adduits afin d'augmenter la sensibilité de la méthode, (3) une phosphorylation des adduits par transfert du phosphate radioactif du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ grâce à la polynucléotide kinase pour former les $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{-3'}$ -diphosphonucléotides, et (4) une séparation des adduits marqués par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince. La quantification est réalisée actuellement par la technologie du phosphore-imaging. La quantification est la préoccupation principale de la méthode de postmarquage au ^{32}P , la récupération des adduits est variable, et des modifications relativement mineures de la procédure classique peuvent introduire de larges différences dans les valeurs des adduits. En conséquence, chaque laboratoire tend à valider son propre « protocole de postmarquage ». Des études interlaboratoires ont été conduites permettant aux différents participants d'analyser les mêmes adduits, chacun suivant son propre protocole, en vue de valider un protocole standard unique ; par la suite, deux méthodes ont été établies pour lesquels les résultats sont en accord entre les laboratoires (Phillips et Castegnaro, 1993, 1999).

1.5.2. Avantages et inconvénients de la méthode

Le marquage de l'ADN, par la méthode du post marquage au ^{32}P , est très utilisé comme biomarqueur d'effet biologique, en particulier pour la détection d'adduits générés par des produits d'origine environnementale. En effet, cette méthode présente un certain nombre d'avantages (La et Swenberg, 1996 ; Garner, 1998 ; Kriek *et al.*, 1998) :

- Elle ne nécessite pas de connaître au préalable, la structure chimique des adduits et est généralement applicable à la mesure des adduits à l'ADN non identifiés.
- Elle possède une sensibilité élevée et permet de détecter des faibles taux d'adduits (jusqu'à un adduit/ 10^{10} nucléotides).
- Elle ne requiert que quelques microgrammes d'ADN.
- C'est une méthode non invasive puisqu'elle évite l'utilisation de substances radioactives *in vivo*.
- Elle permet des études épidémiologiques.
- Elle donne des résultats quantitativement reliés avec l'exposition.
- Elle permet de quantifier chaque type d'adduit sans même en connaître la structure chimique.

Cette technique présente certains inconvénients :

- C'est une méthode non automatisable, nécessitant du temps.
- Elle nécessite l'utilisation et la manipulation de substances radioactives.
- C'est une technique relativement coûteuse.
- Elle ne permet pas de donner la nature (structure chimique) des adduits, bien que les conditions de migration permettent de caractériser la famille chimique à laquelle le composé appartient. Toutefois, il est possible de lui attribuer une structure chimique par comigration à condition de disposer du standard correspondant.

Tableau 1 : Méthodes qui peuvent être utilisées pour détecter les adduits à l'ADN (Faucet-Marquis, 2005)

Méthode	Sensibilité (adduit/nucléotide)	Quantité d'ADN nécessaire (µg)	Avantages	Inconvénients
³² P postmarquage	1/10 ⁹ -1/10 ¹⁰	1-10	Sensibilité, faible taux d'ADN	Travail laborieux, variations de l'efficacité du marquage
Immunoassay	1/10 ⁸	1-100	Sensibilité faible taux d'ADN	Spécificité dépendant de la qualité de l'anticorps
GC/LC-MS	1/10 ⁷ -1/10 ⁸	10-100	Spécificité	Equipement cher, taux élevés d'ADN
Electrophorèse/HPLC avec détection par fluorescence ou électrochimie	1/10 ⁸	10-100	Spécificité et sensibilité	Limité à certains adduits, taux élevés d'ADN
Spectrométrie de masse avec accélérateur de particules (AC-MS)	1/10 ¹¹	1-1000	Spécificité et sensibilité	Limité à certains adduits

2. Les levures

Les levures peuvent être définies comme étant des champignons unicellulaires se reproduisant par bourgeonnement ou fission (Kreger-van Rij, 1984). Elles sont ubiquistes dans l'environnement et peuvent donc adapter leur métabolisme à des sources nutritives très variées. Cette flexibilité métabolique est due en majeure partie à une large gamme d'enzymes extra et intracellulaires capables de dégrader des biopolymères complexes tel que l'hydroxylation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, de stéroïdes et d'alcanes. Ces bioconversions sont souvent effectuées par des monooxygénases appartenant à la famille des enzymes cytochrome P450 (CYP), ainsi que nombreux autres mécanismes de défense incluant des peroxydases, la superoxyde dismutase, la catalase, des antioxydants, et autres (Van Den Brink *et al*, 1998 ; Balzan *et al*, 1999 ; Lee *et al*, 2001 ; Rodriguez *et al*, 2004).

Ainsi, l'engagement de ces microorganismes dans divers phénomènes naturels a toujours soulevé un intérêt scientifique considérable à leur égard. Actuellement, les levures sont probablement les organismes eucaryotiques dont la biologie cellulaire est la mieux étudiée. Ceci tient à leurs activités biochimiques exploitées sur le plan industriel, mais aussi à la simplicité de leur organisation unicellulaire et à leur croissance rapide dans les conditions contrôlées du laboratoire, qui en font un modèle expérimental particulièrement commode (Bocquet, 1993 ; Ohgiya *et al*, 1997 ; Murray et Correia, 2001). Par ailleurs, elles sont un outil précieux et indispensable en ingénierie génétique. Manipulations, recombinaisons, caractérisation et expression de gènes d'origine homologue et hétérologue, obtention et sélection de mutants et de souches améliorées, et fusion de protoplastes, ont tous contribué à l'immense développement de la méthodologie génétique et à la mise en place de nouveaux procédés pour l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique (Magdolen *et al*, 1990 ; Seghezzi *et al*, 1991 ; Cullin, 1992 ; Galzy, 1993 ; Alvarez *et al*, 1994 ; Yabusaki *et al*, 1995 ; Skaggs *et al*, 1996 ; Ohashi *et al*, 2003 ; Dassa *et al*, 2005).

En outre, elles sont de plus en plus exploitées comme système modèle en matière de cytotoxicité et génotoxicité de substances chimiques et toxines naturelles (Averbeck *et al* ; 1993 ; Averbeck et Averbeck, 1994 ; Fasullo *et al*, 1994 ; Pelkonen *et al*, 1994 ; Sengstag *et al*, 1997 ; Poli *et al*, 2002 ; Kaszycki *et al*, 2004). Ceci rejoint la tendance mondiale de limiter l'utilisation des animaux et assurer le développement et la mise au point de tests rapides, efficaces, et peu coûteux. Elles sont donc proposées comme test complémentaire et même alternatif dans les études de toxicité pour l'évaluation de la toxicité et la recherche des mécanismes d'action de diverses molécules, surtout les fongicides (Doignon *et al*, 1993 ; Morace *et al*, 1997 ; Ribeiro *et al*, 2000 ; Ballatori et Villalobos, 2002 ; Cabral *et al*, 2003 ; Lucau-Danila *et al*, 2005).

Finalement, toutes ces applications se trouvent validées par les résultats du projet international de séquençage génomique qui démontre une remarquable similarité du génome humain avec celui d'organismes plus anciens tel que *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, et *Drosophila melanogaster* ; *S. cerevisiae* fût le premier organisme à avoir le séquençage complet de son génome, ouvrant la voie à une nouvelle classe de questions scientifiques (Alberts *et al*, 1988 ; Goffeau *et al*, 1996 ; Lander *et al*, 2001 ; Venter *et al*, 2001 ; Dolinski et Botstein, 2006). Cette conservation des séquences et des fonctions à travers l'évolution entre des formes très variées de la vie a créé une sorte d'unification dans le monde de la biologie moléculaire ; et le modèle expérimental levurien a présenté la plus grande traçabilité expérimentale, spécialement avec le système humain (Rubin *et al*, 2000 ; Dolinski et Botstein, 2006).

Les levures offrent donc l'intérêt d'être des microorganismes industriels utilisés de longue date grâce à leur rôle traditionnel comme agents de fermentation alcoolique, dont la culture est bien maîtrisée, le génome simple et très étudié, et qui en tant qu'eucaryotes, sont potentiellement un modèle convenable pour les organismes supérieurs.

Ainsi, le développement spectaculaire des techniques moléculaires chez les levures, en particulier *Saccharomyces cerevisiae*, fait que cette levure est actuellement l'organisme de référence en biologie cellulaire et moléculaire des eucaryotes (Lacour *et al*, 1996 ; Van Den Brink *et al*, 1998 ; Schägger, 2002 ; Ballatori et Villalobos, 2002 ; Fang et Beattie, 2003 ; Hwang *et al*, 2005 ; Hiraga *et al*, 2005).

2.1. Le cycle de croissance

La croissance d'un microorganisme est pratiquement synonyme de multiplication, elle correspond à l'augmentation du nombre d'individus.

Le cycle de croissance consiste en 3 phases principales.

Il commence par une phase de croissance exponentielle au cours de laquelle le temps de génération prend sa valeur minimale et la population croît considérablement, suivie d'une phase quasi stationnaire caractérisée par un taux nul de croissance, enfin une phase de déclin ayant un taux de mortalité élevé dû à l'épuisement du substrat et l'accumulation de métabolites toxiques (Bocquet, 1993 ; Jackson, 1994). Une phase de latence peut précéder ces 3 phases, il s'agit d'une période d'adaptation au cours de laquelle la cellule synthétise certaines de ses enzymes (Bouix et Leveau, 1993 ; Jackson, 1994 ; Wright *et al*, 1995).

Pratiquement, la cinétique de la fermentation s'écarte du schéma théorique, la phase exponentielle de croissance est absente et la conversion du sucre en éthanol est due en sa majorité à une population levurienne en phase stationnaire ou en déclin (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996). En effet, au début de la phase stationnaire, tout au plus la moitié du sucre est métabolisé, le reste est fermenté durant les 2 phases stationnaire et de déclin qui constituent 80% de la durée de la fermentation (Jackson, 1994 ; Sablayrolles *et al*, 1996). Donc, l'activité levurienne en fermentation alcoolique est la synthèse de 3 types de réactions : croissance, production et maintenance, et les deux premières n'évoluent pas de pair. (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996).

La croissance levurienne peut être l'objet de nombreuses inhibitions, par les substrats, les produits, ou des composés « extérieurs ». Ces derniers peuvent perturber le fonctionnement de divers réactions enzymatiques par des mécanismes d'inhibition compétitive ou non compétitive, ou encore altérer le fonctionnement normal de certaines structures cellulaires comme les membranes ; l'exemple typique est celui des pesticides (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996 ; Cuinier, 1996 ; Šajbidor *et al*, 1999).

2.2. La physiologie des levures

Plusieurs caractéristiques physiologiques des levures contribuent à leurs succès en tant que microorganismes industriels.

2.2.1. Besoins nutritifs

Pour leur vie, pour leur développement et pour l'expression de leurs propriétés, les microorganismes ont besoin d'énergie et d'éléments nutritifs. Leur croissance est considérée comme une série d'interactions entre la cellule et l'environnement, celui-ci devant fournir les éléments nécessaires à la nutrition et, de plus, sous forme utilisable par ces microorganismes.

Nutrition carbonée

Le carbone est le composé majeur de la cellule, il constitue environ 50% du poids sec (Bocquet, 1993). Les composés carbonés sont utilisés à la fois comme source d'énergie fournie par leur oxydation et de carbone exigé pour la biosynthèse des constituants cellulaires (Arnaud et Guiraud, 1993).

Les glucides sont les plus utilisés : glucose, fructose et mannose sont consommés par plus de 400 espèces décrites (Botton, 1991), *Saccharomyces cerevisiae* est incapable d'utiliser les pentoses alors que certaines espèces de *Metschnikowia* peuvent convertir le D- Xylose en éthanol (Bouix et Leveau, 1993).

La voie de dégradation des glucides est la glycolyse qui convertit les sucres en pyruvate, la destinée de celui-ci dépend surtout du type de levure considéré. Pour les aérobies strictes, le pyruvate est complètement oxydé par le cycle de Krebs couplé avec la chaîne respiratoire ; tandis que chez les anaérobies facultatives, la respiration et la fermentation contribuent ensemble à la dégradation du glucose. Selon la prédominance de l'un ou l'autre des deux métabolismes on peut distinguer le type oxydatif et le type fermentaire (Botton, 1991 ; Freire-Picos *et al*, 1995). Pour ce dernier, les glucides sont surtout transformés en éthanol, une petite proportion va former du glycérol (Martinez *et al*, 1998).

Nutrition azotée

L'azote est quantitativement le substrat de deuxième importance pour la levure (Bocquet, 1993), son rôle est capital car il est constitutif des molécules simples et des macromolécules essentielles au fonctionnement cellulaire (Bouix et Leveau, 1993). La plupart des levures sont capables d'utiliser les sources azotées minérales simples, mais aussi des composés organiques divers tels que les acides aminés et les peptides (Botton, 1991)

Saccharomyces cerevisiae est incapable d'utiliser les nitrates (Bouix et Leveau, 1993) et les nitrites sont toxiques pour beaucoup d'espèces (Botton, 1991).

Nutriments spécifiques

Certaines substances sont nécessaires à des concentrations assez faibles.

Les minéraux et oligo-éléments (sodium, fer, calcium, chlore, magnésium et autres) sont souvent fournis par les impuretés des autres ingrédients. La majorité sont des constituants essentiels des systèmes enzymatiques (Bocquet, 1993).

Les facteurs de croissance agissent sur la multiplication et l'activité cellulaires, leur carence perturbe le métabolisme (Bocquet, 1993). La thiamine joue un rôle dans le métabolisme respiratoire, le métabolisme des lipides, la glycolyse et la fermentation alcoolique (Bouix et Leveau, 1993), et les déficiences en pyridoxine et acide pantothénique (incorporé dans les coenzymes A) peuvent altérer le métabolisme levurien (Jackson, 1994).

Facteurs de survie

La notion de facteurs de survie concerne le mode d'action des stérols et de certains acides gras insaturés à longue chaîne sur l'activité des levures. Ces composés constitutifs des membranes cytoplasmiques permettent à la levure de faire le transfert des nutriments et de s'adapter à la présence de l'éthanol (Charpentier, 1993). En leur absence, l'activité de croissance dans un premier temps et de fermentation dans un deuxième va ralentir et stopper (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996).

Leur biosynthèse dépend du métabolisme oxydatif (Martinez *et al*, 1998) ; en anaérobiose ils doivent être fournis dans le milieu ainsi que des substances capables d'adsorber les acides gras toxiques tel que le charbon actif et les enveloppes cellulaires (Lubbers *et al*, 1994).

2.2.2. Conditions physico-chimiques

Outre les exigences nutritives, le développement microbien est sous la dépendance de paramètres environnementaux créés autour de lui par son milieu. Les levures tolèrent de larges gammes de pH (de 3 à 8), et la température courante de leur culture se situe entre 25 °C et 30 °C.

Oxygène

Le développement de la levure et la fermentation ne sont pas possibles en l'absence complète d'oxygène ; il n'y a pas de levures anaérobies strictes (Bouix et Leveau, 1993).

Une anaérobiose partielle augmente l'utilisation du glucose par la levure et améliore sa production de biomasse et sa capacité fermentaire, en permettant la biosynthèse des stérols et des acides gras insaturés à longues chaînes constitutifs des membranes (Charpentier, 1993 ; Venturin *et al*, 1994).

Ethanol

Selon les souches et l'état physiologique de la culture, l'éthanol est toxique pour des concentrations de 8 à 18 % en volume et peut entraîner la mort des cellules (Charpentier, 1993). Les molécules d'éthanol vont se substituer aux molécules d'eau à l'intérieur de la membrane plasmique, réduisant ainsi sa fluidité et sa perméabilité et entraînant une inhibition du transport de substrat (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996). Toutefois, les levures ont la possibilité de corriger l'action de l'éthanol en augmentant la proportion d'acides gras insaturés à longue chaîne et des stérols membranaires (Charpentier, 1993).

2.2.3. Régulation fermentation – respiration

L'oxygène seul ne suffit pas à faire basculer le métabolisme d'une voie métabolique à une autre. Effectivement, dès l'instant où le taux de substrat dépasse une certaine valeur critique (de l'ordre de 1 à 5 g.L⁻¹) la levure produit de l'éthanol quelque soit le niveau d'aération considéré (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996 ; Vasserot, 1996).

Chez *S. cerevisiae*, l'adaptation respiratoire est un programme génétique complexe assurant la synthèse de l'ATP dans un milieu pauvre en glucose (Wright *et al*, 1995). Des concentrations élevées de glucose peuvent inhiber la respiration cellulaire, ce phénomène s'appelle effet Crabtree. Ainsi, en présence d'oxygène et de forts taux de substrats on va avoir une saturation de la voie respiratoire et l'excédent de pyruvate sera alors détourné vers la voie fermentaire qui va ainsi se mettre à fonctionner parallèlement à la voie respiratoire ; C'est le métabolisme respiro-fermentaire (Vasserot, 1996). Au cours des cultures fermentaires, une synthèse des cytochromes mitochondriaux est observée durant la phase de croissance, une fois la quantité de biomasse maximale est atteinte, la teneur cellulaire en cytochromes commence à décroître (Salmon *et al*, 1998). La consommation limitée d'oxygène est liée au fonctionnement de plusieurs voies respiratoires, différentes de la respiration classique, mettant en œuvre l'activité des cytochromes synthétisés ; une partie mineure, seulement 15 % de la consommation totale en oxygène, est destinée à la synthèse de l'ergostérol membranaire (Salmon *et al*, 1998).

S. cerevisiae requiert de très faibles quantités d'oxygène dissous pour la synthèse de ses enzymes respiratoires, le niveau mi-maximum des cytochromes membranaires est atteint pour des

concentrations d'oxygène de 0,1 et 1 μM pour les cytochromes *b*, *c*₁, et *aa*₃ respectivement, valeurs en accord avec la concentration d'oxygène dissous durant la fermentation (Salmon *et al*, 1998).

2.3. Bioconversions et réactions de défense

A part la production et la sécrétion d'enzymes et de métabolites primaires et secondaires, les levures peuvent mettre en œuvre une série de réactions et bioconversions allant de la dégradation des xénobiotiques (alcanes, hydrocarbures aromatiques polycycliques, trinitrotoluène, benzoate, pesticides, toxines naturelles,...) à la production de substances complexes tel que les stéroïdes (Van Den Brink *et al*, 1998 ; Nishimura *et al*, 2001 ; Zaripov *et al*, 2002 ; Fickers *et al*, 2005).

La capacité des levures à modifier les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) est déjà assez connue (figure 4) (King et Wiseman, 1987 ; Cerniglia, 1984, 1992) ; les métabolites produits incluent les phénols, les trans-dihydrodiol, les quinones et les tétralones ; avec des intermédiaires époxyde instables. Ceci est effectué par des réactions similaires à celles connues en pharmacologie en tant que réactions de la phase 1 ; elles sont là aussi, chez les mycètes, catalysées par des monooxygénases contenant les systèmes enzymatiques cytochrome P450, et elles sont suivies par des réactions de la phase 2 qui assurent la conjugaison des métabolites avec le sulfate, l'acide glucuronique, le glucose, le xylose ou autres. Toutes ces réactions s'effectuent dans le cadre de la détoxification et doivent donner, dans la majorité des cas, des produits moins toxiques que les HAPs d'origine ; cependant, des substances plus réactives, mutagènes et carcinogènes peuvent être formés (Sutherland, 1992 ; Yamaguchi et Kuo, 1995). Par exemple, lorsqu'une monooxygénase catalyse une oxydation ultérieure d'un HAP trans-dihydrodiol, le résultat est un dihydrodiol époxyde, hautement réactif, tel que le benzo(a)pyrène trans-7,8-dihydrodiol 9,10-époxyde (BPDE), métabolite ultime mutagène et carcinogène du benzo(a)pyrène (B(a)P) (Thakker *et al*, 1985 ; Braithwaite *et al*, 1998). Les quinones générées représentent par elles-mêmes une classe de substances à intérêt toxicologique vu leur capacité à former des adduits à l'ADN et à l'ARN et aussi de créer des effets cytologiques délétères par stress oxydatif ; leur métabolisme et toxicité ont été démontrés et détaillés dans les levures (Rodriguez *et al*, 2004). C'est le cas aussi des phénols, intermédiaires ou produits très toxiques de nombreuses réactions, qui subissent la biodégradation de nombreuses espèces de levures et présentent des inhibitions de la croissance (Bergauer *et al*, 2005).

L'activité biocatalytique de différents isoenzymes du cytochrome P450 levurien, surtout ceux de *S. cerevisiae*, a été démontrée par des études *in vitro* dans des mélanges réactionnels, vis-à-vis de plusieurs HAPs surtout le B(a)P, HAP modèle (King *et al*, 1984 ; Van Den Brink *et al*, 1998) ; Torres *et al* (1995) ont obtenu l'oxydation de l'anthracène en anthraquinone, du pyrène en 1,8-pyrenedione, du dibenzothiophène et du carbazole en deux produits non identifiés. Par ailleurs, la croissance du microorganisme dans un milieu contenant du B(a)P entraîne l'induction de l'isoenzyme responsable de la biodégradation des HAPs parmi les autres isoenzymes présents (King *et al*, 1984). Ces activités enzymatiques ont été améliorées et optimisées chez les mycètes en général dans le but de leur exploitation comme bioremède de pollution (Field *et al*, 1995 ; Launen *et al*, 1999 ; Steffen *et al*, 2003).

Des travaux de clonage, surexpression et séquençage des gènes codant de nombreuses protéines correspondant à la dégradation des HAP chez les microorganismes ont été réalisés : déshydrogénases, sous unités α et β de dioxygénases et autres, aussi la confirmation de leur fonctionnalité en présence de HAPs de poids moléculaire faible ou élevé (Guengerich *et al*, 1993 ; Khan *et al*, 2001 ; Kim *et al*, 2006).

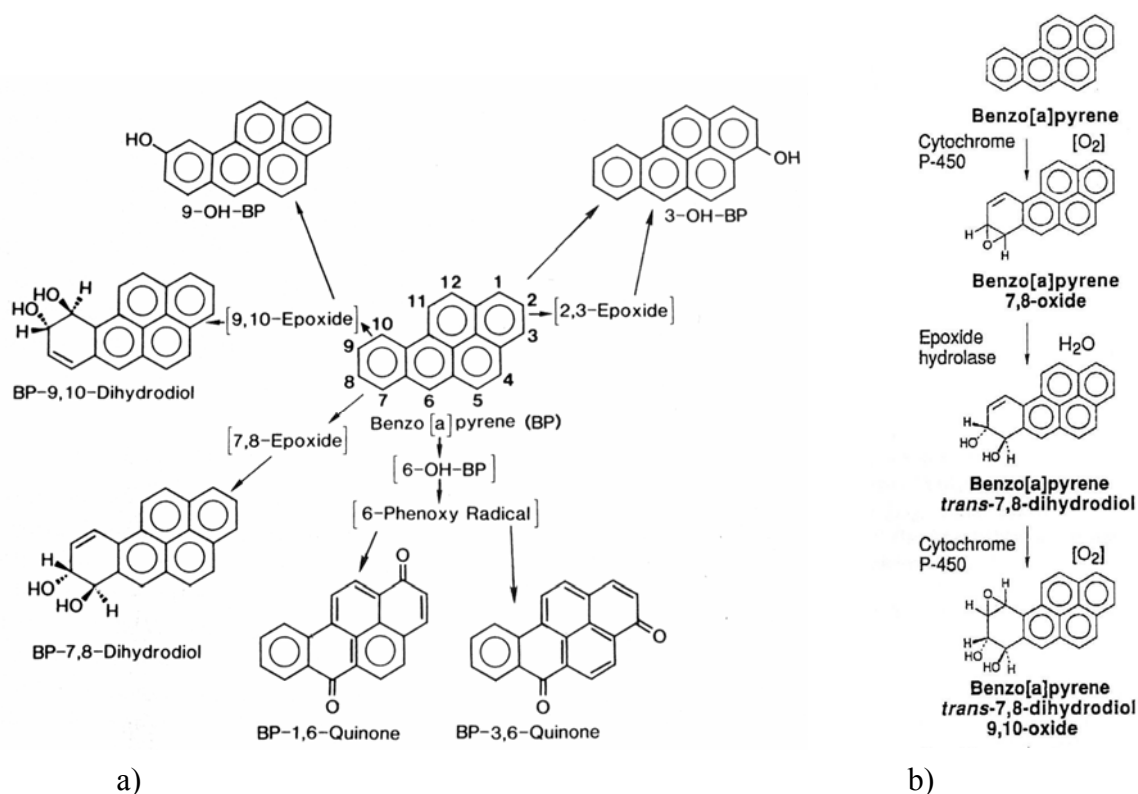


Figure 4 : Métabolisme du benzo(a)pyrène chez les mycètes (a) et formation du BPDE par *Cunninghamella elegans* (b) (Cerniglia, 1984 ; Sutherland 1992)

La bioconversion des toxines naturelles par les levures, n'a pas été moins étudiée ; et dans ce cas aussi, les réactions sont similaires à celles réalisées chez les eucaryotes supérieurs. L'intérêt de la santé publique s'est surtout porté vers les aflatoxines qui présentent la plus grande incidence sanitaire et commerciale (Troxel *et al*, 1997 ; Breinholt *et al*, 1999 ; Parlat *et al*, 2001 ; Cupid *et al*, 2004). C'est l'aflatoxine B₁ (AFB₁) qui est la plus prévalente et cancérigène, elle a été classée catégorie I carcinogène humain par l'IARC (*International Agency for Research on Cancer*), sa biotransformation par les cytochromes P450 joue un rôle crucial dans sa toxicité (figure 5) (Gallagher *et al*, 1996 ; Wang et Groopman, 1999 ; Guo *et al*, 2005, 2006). Elle est bioactivée par époxydation de la double liaison du cycle furane terminal pour générer l'intermédiaire hautement réactif AFB₁-8,9-époxyde, qui peut réagir avec les acides nucléiques et les protéines. La liaison covalente avec l'ADN se fait majoritairement sur l'azote en sept de la guanine pour donner l'adduit AFB₁-N⁷-Gua plutôt instable, et qui va, soit libérer l'AFB₁-8,9-dihydrodiol et restaurer ainsi les sites guaniliques, soit subir une dépurination et créer un site apurinique dans l'ADN, soit se convertir en un adduit stable, non réparable, le AFB₁-formamidopyrimidine (AFB₁-FAPY), qui peut persister durant plusieurs cycles de réplication de l'ADN (Wang et Groopman, 1999 ; Keller-Seitz *et al*, 2004). Un autre adduit, le 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, serait le résultat d'un stress oxydatif induit par l'aflatoxine B₁, dont les différentes étapes restent à clarifier (Bedard et Massey, 2006).

Ces réactions enzymatiques sont cette fois exploitées dans le contexte de décontamination de la nourriture d'animaux ; grâce à leur capacité de prélever et dégrader l'aflatoxine, les levures ont prouvé être des agents efficaces et fiables (Stanley *et al*, 1993 ; Parlat *et al*, 2001).

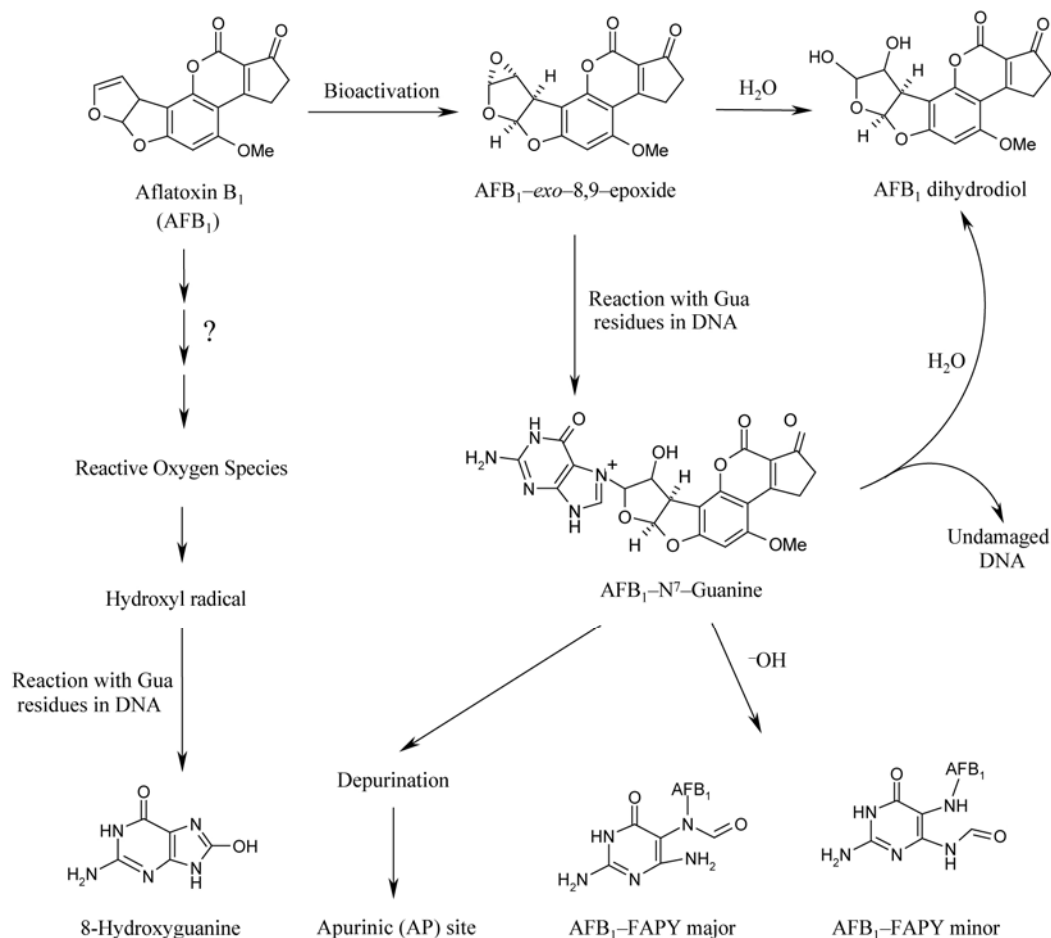


Figure 5 : Métabolisme de l'aflatoxine B₁ (Bedard et Massey, 2006)

Une autre classe très étudiée de bioconversions, effectuée par le système enzymatique cytochrome P450 des mycètes, est l'hydroxylation stéréospécifique des stéroïdes à intérêt pharmaceutique, spécialement la progestérone (Van den Brink *et al*, 1998). Ce type de transformation microbiologique peut remplacer une douzaine de réactions chimiques séparées, contribuant à une production des stéroïdes avec haute efficacité et faible coût. Parmi ces hydroxylations des stérols catalysées par le Cytochrome P450, la 14 α -déméthylation du lanostérol dans les levures aboutissant à la formation de l'ergostérol, l'homologue du cholestérol des mammifères, qui assure le maintien de la fluidité membranaire et l'accomplissement du cycle cellulaire (Van den Bossche, 1988, 1990). La 14 α -déméthylase (CYP51) est attachée au réticulum endoplasmique, elle est parmi les systèmes cytochrome P450 levuriens les plus caractérisés, ainsi que la famille de gènes *cyp51* codant pour cette enzyme ; ces gènes ont été clonés et séquencés chez plusieurs microorganismes, entre autres *S. cerevisiae*. Elle est la cible des fongicides triazoles, leur mode d'action est basé sur l'inhibition de ce système catalytique (figure 6) ; et le développement de nouveaux inhibiteurs de 14 α -déméthylase se fait en fonction des études cinétiques et génétiques concernant cette enzyme (Van Den Brink *et al*, 1996 ; Morace *et al*, 1997).

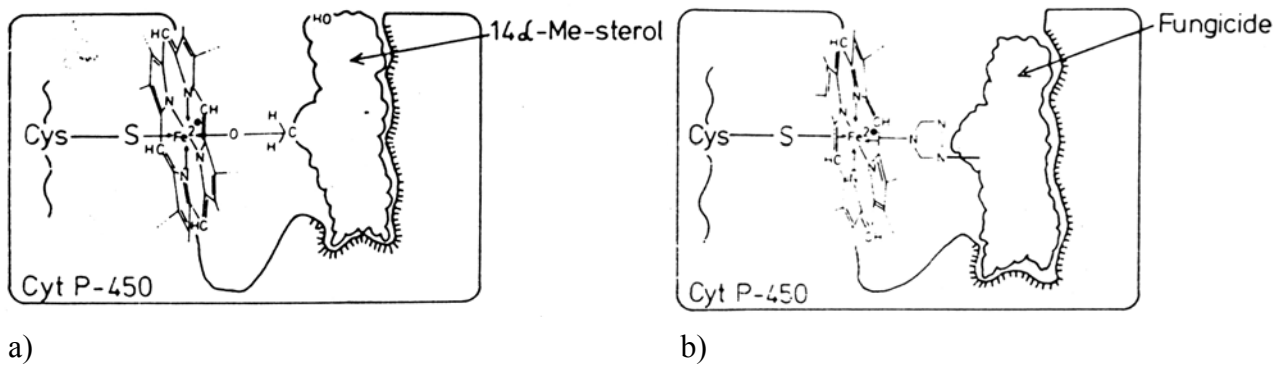


Figure 6 : Les structures proposées des complexes de transition CYP-lanostérol (a) et CYP-triazole (b) (Buchenauer, 1987)

2.4. Génétique moléculaire des levures

2.4.1. Organisation du génome

Le génome levurien est le plus petit de tous les génomes eucaryotes connus, *S. cerevisiae* possède 6000 gènes, 12 millions bp, et 16 chromosomes dont le nombre est très variable entre les espèces. Ce matériel génétique est distribué sur les chromosomes, le DNA mitochondrial et un petit nombre d'éléments extra chromosomiques (Goffeau *et al*, 1996).

La quasi totalité (70 %) du génome chromosomique levurien correspond à une information génétique directe, contrairement au DNA des animaux ou des plantes dont une fraction importante est formée de pseudogènes ou de séquences répétitives non transcrites (Thuriaux et Mosrin, 1991 ; Goffeau *et al*, 1996). Les chromosomes ont une structure semblable à celle des eucaryotes multicellulaires, présentant une association du DNA avec des histones pour former la chromatine organisée en nucléosomes (Fitzgerald *et al*, 1995 ; Maiorano *et al*, 1997). Ces chromosomes contiennent le répertoire complet des histones eucaryotiques, parmi lesquelles l'histone H₁ longtemps supposée absente (Goffeau *et al*, 1996). Les chromosomes de levures sont stables ; durant la mitose chaque chromosome se réplique et puis il y a ségrégation aux pôles du fuseau. La probabilité de perte d'un chromosome est d'environ 10^{-5} par division cellulaire ; cette stabilité est assurée par les centromères (Bouix et Leveau, 1993). De nombreuses homologues de séquences géniques et de leurs fonctions avec des gènes humains ont été mises en évidence (Goffeau *et al*, 1996 ; Paret *et al*, 1999 ; Auclair *et al*, 2003 ; Gomes *et al*, 2005).

Les gènes du DNA mitochondrial (DNAm) (≈ 75000 bp) sont tous ceux des RNAt et des RNAr participant à la traduction des messagers codés par ce DNA, et sept gènes codant pour des polypeptides mitochondriens qui sont l'apocytochrome b, trois sous-unités de la cytochrome c oxydase et trois sous-unités de l'ATPase mitochondrienne (Tian *et al*, 1991 I et II, 1993 ; Bonnefoy *et al*, 1994 ; Szczepanek *et al*, 1994 ; Wright *et al*, 1995). Les levures du genre *Saccharomyces* peuvent cependant être considérées comme des organismes qui ont évolué particulièrement loin vers l'élimination du DNAm puisqu'elles peuvent perdre spontanément tout ou une partie de ce DNA et donner des mutants viables, déficients dans la synthèse protéique mitochondriale, et donc dans la respiration (Tian *et al*, 1991 I et II, 1993 ; Salmon *et al*, 1998 ; Schäfer, 2005).

Le plasmide 2 μ le plus étudié est celui de *S. cerevisiae* (6300 bp). Ce DNA circulaire, non infectieux, est présent dans le noyau à raison d'une quarantaine de molécules. Toutes les séquences codantes transcrites sur ce génome participent à sa répllication ou à sa ségrégation, et ne sont apparemment associées à aucune fonction cellulaire (Thuriaux et Mosrin, 1991).

2.4.2. Le cycle mitotique de division cellulaire

Chaque chromosome est répliqué une fois et une seule par division cellulaire et les deux copies sont transmises de façon symétrique dans les deux cellules filles lors de la mitose. La mitose est coordonnée à la croissance cellulaire de sorte que, dans des conditions de croissance exponentielle, elle se produit autant de fois que le matériel cellulaire double en masse (Thuriaux et Mosrin, 1991). Le cycle mitotique de division, assurant la réplication et la ségrégation du matériel génétique, ainsi que leur coordination à la croissance cellulaire, est gouverné par une famille de gènes gérant le vieillissement cellulaire, la famille SUN (*SIM1*, *UTH1*, *NCA3*) codant pour des protéines participant à la régulation de la réplication, la fréquence de la division cellulaire, le cloisonnement lors de la fission, et aussi la biogenèse des mitochondries (Camougrand *et al*, 2000).

2.4.3. Réparation génétique

De multiples systèmes de réparation corrigent les lésions du génome spontanées ou induites par des agents mutagènes et ceci en coordination avec une haute fidélité de la réplication. Ces systèmes mettent directement en jeu environ une centaine de gènes chez *S. cerevisiae*. Ainsi le taux de mutation, surtout spontanée, est maintenu à un niveau plutôt faible (Thuriaux et Mosrin, 1991).

Les systèmes de réparations levuriens comportent beaucoup de similitudes avec ceux des organismes supérieurs, avec l'implication des mêmes systèmes : réparation directe, NER, BER, MMR et autres ; d'ailleurs, les études correspondant aux systèmes de réparation génétique des mammifères se font majoritairement chez *S. cerevisiae* et y sont déduites par extension (Tijsterman *et al*, 1996 ; Baynton *et al*, 1998 ; Prakash et Prakash, 2000 ; Keller-Seitz *et al*, 2004). Les réactions de réparations des levures ont été reconstituées *in vitro* à l'aide de protéines levuriennes purifiées et d'extraits cellulaires levuriens, en mélange avec du matériel génétique endommagé, confirmant l'efficacité de ces systèmes de réparation (Kong et Svejstrup, 2002).

NER est aussi le système de réparation prédominant chez les levures avec ses deux sous-systèmes, GGR et TCR, semblables aux systèmes humains et se déroulant suivant le même processus : reconnaissance de la lésion, ouverture de l'ADN, excision et élimination d'environ 25 à 30 nucléotides contenant l'adduit, synthèse et ligature. Des homologues à la plupart des protéines engagées dans le NER levurien ont été identifiés chez l'Homme. L'incision chez *S. cerevisiae* requiert les facteurs protéiques de liaison RAD14 (pour XPA), RPA et RAD4-RAD23 (pour XPC-HHR23B), les deux hélicases RAD3 (pour XPD) et RAD25 (pour XPB), les deux endonucléases RAD1-RAD10 (pour XPF-ERCC1) et RAD2 (pour XPG), tous identiques aux facteurs humains correspondant aux mêmes réactions, Le complexe RAD7-RAD16 pour lequel il n'y a pas d'homologue humain est probablement impliqué dans la reconnaissance initiale de la lésion par le GGR levurien (Tijsterman *et al*, 1996 ; Yang *et al*, 1998 ; Prakash et Prakash, 2000 ; Kong et Svejstrup, 2002).

BER participe, mais toujours moins fréquemment que NER, dans les réparations levuriennes ; Girard *et al* (1997, 1998) ont étudié les modalités et l'efficacité de l'élimination de la 7,8-dihydro-8-oxoguanine et des sites AP par le système BER levurien ainsi que le mécanisme catalytique de la glycolase Ogg1 responsable du clivage de la base endommagée.

Le mécanisme NER joue un rôle important dans l'élimination des adduits induits par le benzo(a)pyrène et l'aflatoxine B₁. Pour cette dernière, l'adduit AFB₁-N⁷-Gua, à part sa perte spontanée, peut être sujet à la réparation NER, alors que BER débarrasse les sites AP dans le cas de dépurination ; tandis que AFB₁-FAPY est moins distordant à l'architecture de l'ADN que AFB₁-N⁷-Gua, ce qui le rend relativement résistant à la réparation (Hartwig et Schwerdtle, 2002 ; Guo *et al*, 2005 ; Bedard et Massey, 2006).

Par ailleurs, les mutations induites dans les gènes codant pour NER altèrent l'activité de réparation ; et en l'absence de réparation, la mutagenèse serait le résultat d'un TLS à erreur (Guo *et al*, 2004).

2.5. *Metschnikowia pulcherrima*

Anciennement nommée *Candida pulcherrima*, elle appartient à la classe des Ascomycètes, à la famille des *Spermophthoraceae*, genre *Metschnikowia* (Kreger-van Rij, 1984 ; Bouix et Leveau, 1993). En culture sur gélose à 25°C, elle présente des colonies de couleur spécifique du pigment pulcherrimique rouge brunâtre (Kreger-van Rij, 1984).

C'est une levure généralement abondante sur les fruits (Bizeau *et al*, 1992 ; Dueñas *et al*, 1994 ; Nguyen et Panon, 1998), elle colonise toutes les parties florales et les bourgeons (Janisiewicz *et al*, 2001).

Elle est du type oxydatif, et se range donc parmi les levures de faible capacité fermentaire qui sont les plus puissants producteurs de substances volatiles donnant la flaveur et l'arôme (Heard, 1999). Elle contribue surtout donc aux caractères sensoriels des vins, et assure la mise en condition et le départ des fermentations (Mafart, 1986 ; Dueñas *et al*, 1994 ; Panon, 1997).

Elle est considérée comme excellent candidat pour le contrôle biologique des maladies de post-récolte des pommes ; elle a prouvé un potentiel de biocontrôle puissant contre *Botrytis cinerea*, *Penicillium glabrum* et *Penicillium expansum* et cela sous les températures de 1 à 5 °C et les conditions de l'entreposage des fruits (Sinigaglia *et al*, 1998 ; Janisiewicz *et al*, 2001 ; Spadaro *et al*, 2001). Son mécanisme principal est la compétition avec les pathogènes pour l'espace et les nutriments (Spadaro *et al*, 2001). L'utilisation de cet agent vivant comme antagoniste contre les pathogènes des fruits a émergé comme l'alternative la plus efficace des fongicides (Janisiewicz *et al*, 2001).

2.6. *Saccharomyces cerevisiae*

Elle appartient à la classe des Ascomycètes, à la famille des *Saccharomycetoideae*, genre *Saccharomyces* (Kreger-van Rij, 1984 ; Bouix et Leveau, 1993).

Elle présente un métabolisme respiratoire de capacité limitée (Vasserot, 1996), elle est du type fermentaire (Botton, 1991 ; Belin, 1996). Largement utilisée en fermentation alcoolique industrielle où elle s'est imposée, elle possède une forte tolérance à l'éthanol, aux concentrations élevées de sucre et une stabilité en anaérobiose (Michel *et al*, 1990 ; Jackson, 1994 ; Panon, 1997). Elle est économiquement avantageuse, elle croit et fermente rapidement aux faibles valeurs du pH spécifique du moût (Jackson, 1994 ; Drilleau, 1996). Elle est capable de prédominer surtout pendant les stades tardifs lorsque l'anaérobiose et le taux d'éthanol augmentent (Dueñas *et al*, 1994 ; Bizeau *et al*, 1992).

Par ailleurs, elle possède de nombreux attributs qui s'ajoutent à ses caractéristiques biochimiques et physiologiques, entre autres un génome entièrement séquencé, relativement petit et compacte permettant des analyses globales au niveau du génome en entier, et dont les gènes sont facilement manipulés, effacés, remplacés, ce qui les rend un modèle génétique virtuellement idéal (Ballatori et Villalobos, 2002 ; Dolinski et Botstein, 2006). Par conséquent, elle a servi à des fins biologiques très variées ; on peut citer à titre d'exemple la production de protéines hétérologues tel que l'interféron α humain (Belin, 1996), l'identification et la caractérisation de nombreux gènes humains, animaux et appartenant à d'autres microorganismes tel que la ferredoxine, les Cytochromes P450 1A1 et 3A4, la NADPH-cytochrome P450 oxydoréductase et différents autres systèmes enzymatiques appartenant à la superfamille des Cytochromes P450 (Bligh *et al*, 1992 ; Eugster *et al*, 1992 ; Seaton and Vickery, 1992 ; Hickey *et al*, 1991 ; Boumans *et al*, 1995 ; Ohgiya *et al*, 1997 ;

Murray et Correia, 2001), l'étude des gènes codant les mécanismes moléculaires qui gèrent la transduction du signal cellulaire (Yamaguchi et Kuo, 1995 ; Kawanishi *et al*, 2003) et ceux impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (médicaments, pesticides, toxines, métaux, etc.), la résistance, la toxicité et les cibles nucléaires et nonnucléaires des agents génotoxiques divers (Kalb *et al*, 1987, Ferguson, 1990 ; Weber *et al*, 1990 ; Endo-Ichikawa *et al*, 1995 ; Hargreaves *et al*, 1996 ; Morace *et al*, 1997 ; Liu *et al*, 1997 ; Parry, 1999 ; Ohashi *et al*, 2003 ; Gomes *et al*, 2005), et la réparation de l'ADN (Sancar et Tang, 1993 ; McA'Nulty et Lippard, 1996 ; Brooks *et al*, 2000 ; Kiakos *et al*, 2002 ; Bedard et Massey, 2006). Toutes ces réalisations ont largement contribué à élucider ces différents mécanismes chez tous les eucaryotes, rendant ce modèle particulièrement robuste.

3. Les pesticides

Le Codex Alimentarius (FAO/OMS, 1994) définit comme pesticide toute substance destinée à prévenir, détruire, attirer, repousser ou lutter contre tout élément nuisible, plante ou insecte, pendant la production, l'entreposage, le transport, la distribution et la transformation de denrées alimentaires, de produits agricoles ou d'aliments pour animaux. Leur immense succès dans les applications agricoles afin d'optimiser la productivité des denrées, a entraîné une étendue rapide de leur production et utilisation. Mais, vu leurs propriétés toxicologiques, ubiquité, persistance, présence et concentration dans la chaîne alimentaire, ils constituent un véritable danger, et sont actuellement considérés parmi les principaux polluants environnementaux, à l'origine de résidus toxiques dans l'air, le sol et l'eau (Urban et Cook/EPA, 1986 ; Rakitsky *et al*, 2000 ; McCarroll *et al*/EPA/OPP, 2002 ; Pereg *et al*, 2002 ; Sanderson *et al*, 2002 ; Perera *et al*, 2005 ; Watanabe-Akanuma *et al*, 2005). Leur utilisation massive dans les secteurs agricole, industriel et médical constitue donc une réelle menace mondiale.

L'intérêt public croissant à propos des risques liés à leur utilisation a généré un support pour le développement de méthodes alternatives non chimiques (Moline et Locke, 1993 ; Sinigaglia *et al*, 1998 ; Teixidó *et al*, 1999 ; Spadaro *et al*, 2001 ; Janisiewicz *et al*, 2001), la recherche continue de nouvelles méthodes analytiques pour contrôler les résidus (Cabras *et al*, 1999 ; Pogacnik et Franco, 1999 ; Jeannot *et al*, 2000 ; Wu *et al*, 2001 ; Ambrus, 2004 ; Takino *et al*, 2004 ; Baril *et al*, 2005 ; Ye *et al*, 2006), et la mise en place de strictes réglementations (Union Européenne, 2004 ; FAO/OMS, 2004). Ceci s'est traduit par une restriction de l'homologation de nouvelles substances, une interdiction de certaines molécules très rémanentes comme les pesticides organochlorés (OMS, 1984), et le respect des Bonnes Pratiques Agricoles (BPA) pour leur application (FAO/OMS, 1994, 2004). Toutefois, et malgré les efforts déployés dans tous les sens et les solutions établies et mises en œuvre, les résidus toxiques et les mélanges multirésidus très dangereux persistent toujours dans les denrées alimentaires et l'environnement (Nishimura *et al*, 2001 ; Tsakiris *et al*, 2002, Akiyama *et al*, 2005 ; Aulakh *et al*, 2006). Or, l'utilisation intensive de ces produits dépend d'une stratégie de production et commercialisation des denrées alimentaires et leur bénéfice vis-à-vis de la qualité et la quantité des denrées disponibles au consommateur est évident (Verschueren, 2001). Pour les pays en voie de développement, en l'absence de ces moyens efficaces de lutte, la diminution de la protection alimentaire pourrait être dramatique (Geahchan et Abi Zeid Daou, 1995).

Par conséquent, et face à cette dualité bénéfice-risque, la protection de la santé humaine contre l'exposition aux pesticides demeure une préoccupation majeure, et le problème de résidus toxiques reste d'actualité.

3.1. Classification

D'après leur cible, les pesticides sont divisés en herbicides, insecticides, fongicides, acaricides, molluscicides, nématocères, rodenticides et corvicides.

Selon leur structure chimique, ils peuvent être organochlorés, organophosphorés, organostaniques, carbamates, benzimidazoles, triazoles, pyréthrinoides de synthèse, pyrimidines et autres.

3.2. Résidus et indices toxicologiques

Selon le Codex Alimentarius (FAO/OMS, 1994), un résidu de pesticide est toute substance (dérivé, métabolite, impureté...) présente dans les aliments, les produits agricoles ou les aliments pour animaux par suite de l'utilisation d'un pesticide.

Les résidus de pesticides sont le souci permanent de la communauté scientifique et des organisations de santé publique à travers le monde. La surveillance des résidus de pesticide est un outil clé pour assurer la conformité avec la réglementation et contrôler le respect des Bonnes Pratiques Agricoles (Picó *et al*, 2004). Résidu toxique signifie évidemment tout résidu pouvant avoir une importance sur le plan toxicologique dans la marge des doses résiduelles ; il n'y a pas de composé toxique mais plutôt des doses toxiques (Abhauer, 1991). Pour cela, nombreuses méthodes hautement sophistiquées ont été mises au point pour détecter, identifier et mesurer les multirésidus contaminant des matrices de différentes natures (Juhasz et Naidu, 2001 ; Young *et al*, 2001 ; Fussel *et al*, 2002 ; Cliff *et al*, 2003 ; Baril *et al*, 2005). Le contrôle est une tâche assez complexe étant donné qu'il existe actuellement plus de 8500 formulations commerciales comprenant environ 1000 matières actives, qui constituent à leur tour une source de plusieurs centaines de produits de dégradation. Les procédures classiques habituellement appliquées, consistent essentiellement en un prétraitement tel que l'extraction par un solvant organique, ensuite la purification par les colonnes chromatographiques, suivis par une analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC) ou liquide (LC) couplée à différents types de détecteurs spécifiques pour les différentes propriétés physicochimiques des molécules : par capture d'électron (ECD), pour l'azote et le phosphore (NPD) et par spectrométrie de masse (MS) ou autres (Zambonin *et al*, 2002 ; Millán *et al*, 2003 ; Pan et Ho, 2004 ; Tröskén *et al*, 2005 ; Ye *et al*, 2006).

Les différentes méthodes utilisées ont souvent reporté la présence de résidus, parfois à des niveaux alarmants mais le plus souvent inférieurs aux normes. Toutefois, l'étude des résidus constitue une partie intégrante du processus d'évaluation du risque, permettant d'explicitier la probabilité continue d'exposition et d'assurer que les doses journalières admises ne soient pas dépassées (Abhauer, 1991 ; Blasco *et al*, 2005). La dose journalière ingérée d'un certain pesticide étant obtenue en multipliant le niveau de résidus de ce pesticide trouvé dans la denrée considérée, par la quantité journalière consommée de cette dernière ; et en additionnant avec toutes les valeurs ainsi obtenues pour ce pesticide dans les autres denrées (FAO/OMS, 2004). En outre, l'information apportée par le dosage des résidus, à part l'évaluation directe de l'exposition humaine, fournit une estimation de l'ampleur du risque sanitaire en général (Valenzuela *et al*, 2001 ; Blasco *et al*, 2002).

3.2.1. Limite maximale de résidus (LMR)

Elle représente selon le Codex les résidus acceptables sur le plan toxicologique, elle est fondée sur les données des Bonnes Pratiques Agricoles et est destinée à être appliquée dans le commerce international. Donc, c'est la concentration en résidus la plus élevée légalement acceptable pour que les denrées alimentaires restent commercialisables, elle s'exprime en milligramme de résidus par kilogramme de produit alimentaire (Cluzeau *et al*, 2000).

3.2.2. Dose journalière admise (DJA)

C'est la quantité d'une substance pouvant être quotidiennement consommée au cours d'une vie entière sans présenter le moindre risque ou effet secondaire (Cluzeau *et al*, 2000).

Elle est déterminée en divisant la dose sans effet (DSE) de l'animal le plus sensible par 100, la dose sans effet étant déduite d'après des études toxicologiques menées à long terme sur les animaux. Elle s'exprime en milligramme (ou microgramme) de résidus par kilogramme de poids corporel (Derache, 1986). Ce facteur de sécurité est augmenté si la substance a un effet toxique irréversible (500 pour des néphrotoxique, 5000 pour des cancérogènes).

3.3. Résidus de pesticides dans les denrées alimentaires

Les fruits sont ravagés par de nombreux insectes et champignons. Ces préjudices peuvent avoir lieu très tôt, d'autres ne surviennent que très tard, peu de temps avant la cueillette ou durant la conservation du fruit. Dans tous les cas l'effet négatif est considérable et la perte est importante. Plusieurs solutions ont été proposées et pratiquées, mais le traitement par des pesticides organiques et systémiques s'est imposé comme la solution la plus efficace et commode. Ils sont appliqués en traitements pré et post-récolte (trempage dans des bains fongicides) pour préserver les denrées dans le champ et lors de l'entreposage et le transport. La liste est importante et les matières actives très variées ; benomyl, folpet, captane, dichlofluanide, mancozèbe, penconazole, fluzilazole, myclobutanil, nitrothal-isopropyl, azinphos-méthyle, imidacloprid, carbendazime, méthidation, chlorpyrifos, diméthoate, fénarimol, cyperméthrine et beaucoup d'autres sont utilisés pour combattre les champignons causant l'altération des fruits et les insectes ravageurs (Swait et Butt, 1990 ; Rueegg et Siegfried, 1996 ; Oliva *et al*, 1999 ; Cabras, et Angioni, 2000 ; Cuthbertson et Murchie, 2003 ; Edder *et al*, 2004 ; Akiyama *et al*, 2005).

Le rapport de la FDA pour les années 1988-1989 concernant l'alimentation des enfants aux Etats-Unis, révèle la détection de résidus de diméthoate (0,2 ppm), benomyl (2,6 ppm), chlorpyrifos (0,9 ppm), captane (3,4 ppm), parathion-méthyle (0,26 ppm) dans les pommes fraîches et 0,2 ppm de diméthoate dans le jus de pommes ; chlorpyrifos (0,5 ppm), parathion-méthyle (0,17 ppm), diméthoate (0,05 ppm) dans le jus d'orange et benomyl (1,11 ppm), captane (9,69 ppm), chlorpyrifos (0,13 ppm), diméthoate (0,087 ppm), et de parathion-méthyle (0,09 ppm) dans les pêches (National Research Council, 1993).

Les organochlorés et les biphényles polychlorés sont très stables, liposolubles, et peuvent s'accumuler et persister longtemps dans le sol, les tissus végétaux et les tissus adipeux. Ils sont neurotoxiques. Ainsi, 20 ans après sa restriction aux Etats-Unis, le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) continue d'être détecté dans le lait maternel dans 19 % des échantillons à des concentrations allant jusqu'à 2 ppm, ainsi que le DDE, son métabolite mais qui est présent dans tous les échantillons. Le dieldrin (2% des échantillons ; 0,071 ppm) et le lindane se retrouvent aussi dans le lait. Ce dernier a été utilisé comme substitut du DDT à cause de sa rémanence inférieure, et ses résidus sont toujours trouvés en moindre quantité (0,12 ppm) (Mattison *et al*, 1992 ; National Research Council, 1993).

Le dicofol, fortement hydrophobe, s'accumule dans les tissus adipeux des bovins nourris par des purées de pommes contaminées (Archer, 1973). Des résidus de fenvalérate, pourtant pyréthrinioïde de synthèse, ont été aussi détectés dans les rations à base de fruits des vaches laitières ; cet acaricide étant souvent pulvérisé sur pomme, la moitié de ses résidus est excrétée dans le lait (Spittler *et al*, 1982).

Par ailleurs, Fittell et Peak (1992) reportent la diminution des résidus de benomyl au dessous de 2 ppm, sa LMR, après un délai avant récolte de sept jours et suite à des applications adéquates. Aussi, des résidus de cyhèxatin sont retrouvés dans les pommes à des teneurs ne dépassant pas 2 ppm, la limite maximale admise pour ce résidu (Anderson *et al*, 1998) ; or cet acaricide est le plus sélectif et le plus utilisé parmi sept autres tolérés pour la lutte contre acariens sur pomme, les cas de résistance à ce produit, signalés au laboratoire ne sont pas forcément associés à une diminution de son efficacité sur le champ (Welty *et al*, 1991 ; Ma, 2005). Certains pesticides appliqués sur la vigne disparaissent à la cueillette, bien sûr avec respect du délai de pulvérisation pré-récolte pour chacun, et présentent des temps de demie vie ($t_{1/2}$) très variés : le cyprodinil ($t_{1/2}$ 12 jours), le mepanipyrim ($t_{1/2}$ 12 jours), le fluazinam ($t_{1/2}$ 4,3 jours), azoxystrobin ($t_{1/2}$ 15,2 jours), et fludioxonil ($t_{1/2}$ 24 jours), alors que le pyrimethanil, le diméthoate et l'azinphos-méthyle restent à peu près constant malgré un temps d'attente de trois semaines (Cabras et Angioni, 2000). Le parathion-méthyle convenablement

appliqué, persiste 8 jours après sa pulvérisation sur pomme, et passé ce délai, la récolte ne présente pas de danger (Tsakiris *et al*, 2002).

Très récemment, un programme de contrôle des fruits à pépins (pomme et poire) et tomate en Suisse (Edder *et al*, 2004) indique un état sanitaire plutôt satisfaisant avec des légers dépassements des normes pour les fruits à pépins (1 % des cultures locales et 2 % de celles étrangères) alors que pour la tomate, les denrées d'origine étrangère présentent plusieurs non conformités (7 %) surtout pour le carbendazim (0,02 ppm), le procymidone (0,38 ppm), le cyprodinil (0,04 ppm) et le chlorothalonil (0,15 ppm) par rapport aux cultures locales toutes acceptables. Dans les fruits à pépins, 75 % des échantillons conformes contiennent des multirésidus et 20 substances ont été identifiées ; les plus fréquentes sont le folpet (0,11 ppm), le primicarb (0,02 ppm), le trifloxystrobin (0,03 ppm), l'indoxacarb (0,02 ppm), le fénoxycarb (0,01 ppm) et le captane (0,06 ppm). Pour la tomate locale, la moitié des échantillons conformes est contaminée aussi par des multirésidus de 15 matières actives contenant principalement le cyprodinil (0,02 ppm), le carbendazim (0,04 ppm), le chlorothalonil (0,09 ppm), le fludioxonil (0,05 ppm), le diethofencarb (0,01 ppm) et le dimethomorph (0,07 ppm). Parmi les échantillons issus de culture organique, une contamination par le cyprodinil (0,01 ppm) et le pyrimethanil (0,01 ppm) est notée pour un échantillon.

Faisant partie du même programme, la surveillance des agrumes (oranges, citron, mandarine et pamplemousse) (Ortelli *et al*, 2005) révèle que 95 % des fruits issus de culture classique présentent une contamination par 38 matières actives avec seulement 2 % de non-conformité, mais des multirésidus dans la majorité. 34 % des agrumes « sans traitement post-récolte » sont contaminés par des pesticides de traitement post-récolte et 6 % contiennent des résidus de penconazole (0,06 ppm) et de chlorpyrifos (1,6 ppm) dépassant leur LMRs. 13 % des agrumes de culture organique sont légèrement contaminés. Les matières actives les plus fréquemment détectées sont l'imazalil (6,1 ppm), le thiabendazole (4 ppm), le carbendazim (0,53 ppm), le chlorpyrifos (1,6 ppm), l'hexythiazox (0,05 ppm) et le méthidation (0,9 ppm).

En Espagne (Blasco *et al*, 2005), les résidus d'imidacloprid, de carbendazim, de methiocarb, et d'hexythiazox dans différents fruits (oranges, mandarines, pastèques et prunes) s'échelonnent entre 0,02 et 0,75 ppm dans 85 % des échantillons dont 10 % dépassent les LMRs, avec la plus grande fréquence pour le carbendazim (67 % ; 0,6 ppm), suivi de l'hexythiazox (21 % ; 0,75 ppm), ensuite le methiocarb (20 % ; 0,35 ppm) et l'imidacloprid (4 % ; 0,07 ppm). Toutes les oranges sont contaminées souvent par des multirésidus, 95 % des mandarines, 33 % des prunes et 23 % des pastèques.

Au Japon (Akiyama *et al*, 2005), un échantillonnage étalé sur trois ans pour différents fruits et légumes indique la détection de 323 matières actives. En tout, 47 % des denrées domestiques et 61 % des importées contiennent des résidus, et 60 % des denrées signalées positives contiennent des multirésidus. La somme des proportions des résidus par rapport aux différentes LMRs a été calculée comme critère représentatif du risque total des multirésidus, elle dépasse 100 % dans trois catégories de légumes congelés importés : épinards, haricots rouges et oignons.

En Inde (Aulakh *et al*, 2006), la détection de pesticides organochlorés, complètement prohibés, dans l'alimentation des poulets, dans leur tissu musculaire et dans les œufs, est signalée tout au long d'un an de surveillance. L'hexachlorocyclohexane (HCH), le DDT, l'endosulfan sulfate et l'époxyde d'heptachlore sont présents à des concentrations de 0,65, 0,91, 0,42 et 0,02 ppm respectivement, dans la nourriture ; alors que ces valeurs deviennent 0,11, 0,24, 0,1, et 0,07 ppm dans les muscles et 0,26, 0,51, 0,17 et 0,11 ppm dans les œufs. Aucun échantillon de chair ne dépasse les LMRs pour les 4 pesticides, alors que la totalité des œufs collectés contiennent des résidus supérieurs aux normes pour l'HCH et l'époxyde d'heptachlore et 58 % pour le DDT.

Par ailleurs, les substances contaminant les fruits, peuvent se trouver aussi dans leurs produits de transformation, toutefois, certaines études ont montré une efficacité notable de la transformation des denrées. Le mancozèbe, fongicide de contact, est capable de pénétrer dans la pulpe de pomme quelques millimètres sous la peau, ses résidus sont élevés dans le moût (5-9 mg.kg⁻¹

CS₂) et le jus (1,4 mg.kg⁻¹ CS₂) ; mais des processus simples tel que le lavage et l'épluchage combinés ont diminué les résidus de 97 % ; ces résidus sont absents dans la confiture et le vin correspondants (Sharma *et al*, 2001). Des résidus d'azinphos-méthyle, chlorpyrifos, esfenvalérate, méthomyl, fénarimol, myclobutanil, thiabendazole, penconazole, bénomyl, et fenvalérate sont ramenés à des teneurs acceptables dans le jus et dans les tranches de pommes congelées, alors qu'ils dépassaient les normes dans le fruit frais (Spittler *et al*, 1982 ; Arauz *et al*, 1990 ; Jones et Ehret, 1993 ; Zabik *et al*, 2000). En contre partie, des résidus d'azinphos-méthyle sont retrouvés dans le jus de pomme (1,2 ppm), alors qu'ils sont indétectables dans le jus d'orange; Appliqué au champ, ce pesticide est faiblement dégradé durant l'entreposage réfrigéré et présente dans ces conditions un temps de demi-vie de 122 jours pour les pommes et 46 jours pour les oranges (Athanasopoulos et Pappas, 1999). Des résidus de thiabendazole (0,17 ppm) et bénomyl (0,07 ppm) sont aussi décelés dans le jus de pomme mais à des teneurs acceptables (Young *et al*, 2001).

La transformation du raisin comprend surtout la production de raisins secs, de vin et de liqueurs. Pour la production de raisin sec, malgré la concentration du produit alimentaire qui a lieu, la teneur résiduelle du benalaxyl, phosalone, et procymidone demeure inchangée, celle de l'iprodione augmente 1,6 fois alors que le vinclozolin et le diméthoate diminuent au 1/3 et 1/5 respectivement, leur dégradation étant peut être due à la chaleur (Cabras et Angioni, 2000). Dans la fabrication du vin, les résidus de l'azoxystrobin, du diméthoate et du pyrimethanil restent constants dans le moût et le vin, alors que le folpet, le chlozolate et le dichlofluanide diminuent, et le myclobutanil, le tétraconazole, le mepanipyrin, le chlorpyrifos et le fluazinam disparaissent complètement à cause de leur instabilité en milieu acide et leur affinité avec la phase solide éliminée (Cabras et Angioni, 2000). Navarro *et al* (1999, 2000) observent la diminution des résidus de chlorpyrifos, penconazole, fénarimol, vinclozolin, metalaxyl et mancozèbe durant l'élaboration de vins rouges, mais le produit fini contient des résidus de toutes les matières actives sauf le chlorpyrifos, le metalaxyl étant le plus persistant (20 %). Dans les liqueurs distillées (Cabras *et al*, 1997), le fenthion, le quinalphos et le vinclozolin sont retrouvés dans le produit final parmi 13 autres pesticides présents au début.

En conséquence, la présence de cette multitude de matières actives simultanément dans chaque denrée, la contamination de produits alimentaires indirectement exposés, et plus grave encore, la détection récente de molécules formellement prohibées partout tel que le DDT, enfin les doses résiduelles trouvées, en accord ou non avec les normes, créent un risque certain pour le consommateur. Un contrôle permanent et régulier des résidus s'avère indispensable, ainsi que des études de toxicité et génotoxicité de ces molécules chimiques très stables faisant partie de notre alimentation quotidienne.

3.4. Toxicité et génotoxicité

En dépit de leur sélectivité et mode d'action spécifique, les pesticides exercent leur nocivité envers les organismes involontairement exposés, suite à la contamination de l'environnement et de la chaîne alimentaire. Ils sont cytotoxiques, neurotoxiques, embryotoxiques, mutagènes, tératogènes ou carcinogènes. Ils exercent leur action toxique par génotoxicité directe, ils peuvent donc subir une activation métabolique et former des intermédiaires électrophiles capables d'interagir avec les acides nucléiques ; ou par d'autres moyens indirects tel que le stress oxydatif, l'inhibition de la communication intercellulaire, la formation de récepteurs activés ou autres (Fishbein, 1977 ; Rakitsky *et al*, 2000 ; Suwalsky *et al*, 2000 ; Lin *et al*, 2002 ; Hurst et Sheahan, 2003). En plus, les effets produits par la combinaison de plusieurs matières actives sont supérieurs aux effets individuels additionnés à cause de l'interaction entre les molécules simultanément présentes. Ainsi, le penconazole stimule la toxicité des organophosphorés (OP) envers les mammifères, ceci résulterait d'une induction du cytochrome P450 responsable de la réaction d'activation des OPs en leur métabolite toxique l'oxon (Levine et Oris, 1999). Pareillement, le propiconazole augmente

l'action toxique du parathion en activant la formation du paraoxon ; la toxicité des pesticides organophosphorés envers des organismes non ciblés serait donc induite par une exposition antérieure au propiconazole (Levine et Oris, 1999). Aussi, le mélange diméthoate, azinphos-méthyle, diazinon, pyrimiphos-méthyle, et bénomyl exerce une toxicité très élevée par rapport aux substances testées individuellement sur des cellules humaines ; les concentrations habituellement trouvées sur les fruits (0,4 à 100 ppm) entraînent une inhibition de l'acétylcholine estérase et de la synthèse protéique, et l'effet du mélange ne peut pas être estimé à partir des tests réalisés séparément pour chaque matière active (Marinovich *et al*, 1996).

La toxicité envers les individus non ciblés commence au site même de l'application du pesticide : le fruit. En effet, la pulvérisation du cyperméthrine, pyrimiphos-méthyle, captane, bénomyl, dinocap, manèbe, tiophanate-méthyle et chlorpyrifos sur pomme entraîne l'augmentation en nombre des mites phytopathogènes en détruisant leur prédateur naturel *Typhlodromus pyri* (Cross et Berrie 1994). Ceci est également observé lors de l'application du penconazole/captane et mancozèbe sur les pommiers pour combattre les moisissures ; il y a alors augmentation des mites nuisibles à cause de la toxicité des fongicides contre leur prédateur naturel *Aculus schlechtendali* (Cuthbertson et Murchie, 2003). Les inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol (EBI) font largement partie des programmes de pulvérisation des fruits ; cette même application du penconazole en combinaison avec le captane, parfois nécessaire sur les pommiers en floraison, peut affecter la germination du pollen (Jester) en la réduisant de 50% (Watters et Sturgeon, 1991). En outre, un déséquilibre des populations microbiennes de bactéries et levures colonisant les fruits est observé lors des traitements par les produits phytosanitaires ; les fongicides entraînent une augmentation des bactéries et une toxicité inégale vis-à-vis des levures détruisant la dynamique établie entre ces populations, qui elle-même peut jouer un rôle bénéfique dans la protection des fruits (Teixidó *et al*, 1999).

Les résidus des matières actives pulvérisées sont répandus dans le terrain des champs, et de nombreux organismes en sont victimes. Ainsi, l'effet du diméthoate a été étudié vis-à-vis des microarthropodes *Folsomia candida* et *Folsomia fimetaria* ; ces deux insectes subissent toujours les effets néfastes des traitements chimiques réalisés dans les champs et l'écotoxicité des résidus distribués dans le sol. L'application du diméthoate à des doses recommandées pour un traitement adéquat a significativement affecté la reproduction et la survie des 2 insectes (Krogh, 1995). C'est le cas aussi de l'isopode *Porcellionides pruinosus* et du ver de terre *Eisenia andrei*, qui endurent l'effet des résidus dans le sol, et qui sont utilisés pour tester la toxicité des pesticides tel que le lindane, le diméthoate, le carbendazim, le bénomyl et le sulfate de cuivre dans le cadre des études d'écotoxicologie des pesticides (Loureiro *et al*, 2005). Les résidus présents dans le sol sont très persistants, dangereux et peuvent causer des adduits à l'ADN chez les plantes même et retarder ou empêcher leur poussée. En effet, seize différents adduits à l'ADN sont détectés dans les feuilles d'houblon recevant les traitements chimiques usuels mais poussant sur un sol antérieurement contaminé par l'heptachlore, et la présence de ces adduits se traduit par un déclin du houblon planté qui serait dû à une perturbation de l'expression génétique à cause des nucléotides hypermodifiés ; alors que huit types d'adduits sont trouvés dans les feuilles d'houblon recevant les mêmes traitements mais poussant normalement sur un sol non contaminé antérieurement (Laouedj *et al*, 1995).

Par ailleurs, l'azocyclotin, le cyhéxatin, le fenbutatin-oxide, le fentin hydroxide et le beta-cyfluthrin, organostaniques et pyréthrinoïdes de synthèse, exercent séparément une toxicité aigue mais différentielle envers des cyanobactéries et des algues vertes qui résulte en un bouleversement de l'équilibre écologique aquatique ; la toxicité des pyréthrinoïdes est inférieure mais leur risque écologique est plus élevé par comparaison aux organostaniques, donc « faible toxicité » ne signifie pas automatiquement « faible risque écologique » (Ma, 2005). Les larves de crevettes (*Litopenaeus stylirostris*) n'en souffrent pas moins, d'ailleurs elles sont souvent utilisées comme biomarqueurs de pollution par les pesticides (Reyes *et al*, 2002) ; les concentrations létales moyennes (CL₅₀) de

plusieurs pesticides ont été déduites suite à l'exposition de ces larves au DDT ($CL_{50} = 10,79 \text{ mg.L}^{-1}$), azinphos-méthyle ($CL_{50} = 1,47 \text{ mg.L}^{-1}$), perméthrine ($CL_{50} = 0,29 \text{ mg.L}^{-1}$), parathion-méthyle ($CL_{50} = 0,038 \text{ mg.L}^{-1}$), chlorpyrifos ($CL_{50} = 2,26 \text{ mg.L}^{-1}$), malathion ($CL_{50} = 34,19 \text{ mg.L}^{-1}$), endosulfan ($CL_{50} = 0,23 \text{ mg.L}^{-1}$), et carbaryl ($CL_{50} = 0,029 \text{ mg.L}^{-1}$). Cette toxicité se traduit par la réduction de la quantité des protéines et de l'ADN indiquant une diminution de la croissance, et des adduits à l'ADN détectés seulement avec le DDT (Reyes *et al*, 2002). Dans le même cadre, et lors d'une investigation à propos de la qualité de l'eau des rivières en Angleterre (Winter *et al*, 2004), un poisson (*Leuciscus cephalus*) est pris comme témoin de la pollution par les pesticides organochlorés, les biphenyls polychlorés et les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Une élévation des cassures d'ADN et une formation d'adduits à l'ADN sont observées ; cette toxicité est plus accentuée dans les zones les plus polluées.

Sur le plan local, une étude menée dans 2 centres hospitaliers, étalée sur les années 1979 à 1992 révèle que les dérivés chimiques représentés essentiellement par les produits phytosanitaires sont responsables de 19 % de la totalité des intoxications (Geahchan et Abi Zeid Daou, 1995). Des enquêtes sont souvent menées auprès des personnes considérées comme exposées à un risque relativement direct par leur mode de vie quotidienne et les adduits à l'ADN sont les biomarqueurs adoptés pour la génotoxicité. Dans ce cadre, des adduits à l'ADN ont été détectés dans les cellules sanguines de personnes travaillant dans la floriculture et exposées quotidiennement à des mélanges de pesticides ; 60 % présentent six différents types d'adduits avec une moyenne de 8,5 adduits par 10^9 nucléotides par rapport aux témoins présentant 2 adduits par 10^9 nucléotides (Munnia *et al*, 1999). Aussi, une induction de l'activité enzymatique des CYP1A1 accompagnée par une formation d'adduit à l'ADN ont été mesurées dans des échantillons de placenta de femmes résidant dans des zones côtières de rivières polluées. Ces femmes sont considérées préexposées à des doses faibles et chroniques d'organochlorés par leur alimentation à base de poissons et l'enquête a été réalisée suite à des effets notés chez les nouveaux nés (Lagueux *et al*, 1999).

Dans les études toxicologiques *in vivo* pour élucider le mécanisme de carcinogénicité du toxaphène (69 % de chlore), le traitement oral des souris pour sept jours par 10, 25, 50 ou 100 mg.Kg^{-1} entraîne une augmentation de la concentration de cytochromes hépatiques accompagnée d'une augmentation du poids relatif hépatique/corporel sans toutefois aboutir à des adduits à l'ADN (Hedli *et al*, 1998). L'azinphos-méthyle, le linuron, le métribuzin, le diquat, et l'imidacloprid ont abouti séparément à la formation d'adduits à l'ADN après une métabolisation dans un essai *in vitro* en présence d'un système à NADPH pour donner 64,1, 28,2, 42,4, 37,8, et 21,6 adduits/ 10^9 nucléotides respectivement (Shah *et al*, 1997). L'application de 50 μM de pentachlorophenol (PCP) et de lindane résulte en une formation de 17 et 15 adduits par 10^9 nucléotides respectivement dans des cultures de cellules hépatiques de rat, 11 et 7,4 adduits par 10^9 nucléotides dans des cultures de cellules de caille et 4,2 et 2,2 adduits par 10^9 nucléotides dans des cultures de cellules hépatiques humaines. Cette différence de réponse aux mêmes pesticides entre les différentes espèces testées, reflète les divergences métaboliques entre elles : chaque type de cellule exprime préférentiellement un type différent de cytochrome P450. La formation d'adduits est accompagnée par une induction des CYP2B et CYP3A sous l'effet du lindane, et les CYP1A et CYP2B et CYP3B sous l'effet du PCP, ceci pour les cellules humaines et animales (Dubois *et al*, 1997). L'endosulfan (50 μM) testé dans les mêmes conditions (Dubois *et al*, 1996) cause 46,1 et 33,8 adduits par 10^9 nucléotides dans l'ADN des cellules hépatiques humaines et animales respectivement, avec une induction simultanée des CYP3A1 chez le rat et CYP3A7 chez les cellules humaines. D'autres tests concernant le pentachlorophenol et ses métabolites quinoïdes soulignent un stress oxydatif en plus de la liaison directe avec l'ADN ; le PCP (exposition chronique *in vivo*, 60 $\text{mg.Kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$, 27 semaines), le tétrachloro-1,4-benzoquinone (test *in vitro*, 5 mM) et le tétrachlorohydroquinone (test *in vitro*, 5 mM) entraînent la formation de différents types d'adduits et l'augmentation significative de 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG), des sites AP, et des cassures monobrin dans l'ADN (Lin *et al*, 2001, 2002). L'alachlore et ses deux principaux métabolites, le 2-chloro-N-(2,6-

diéthylphényl)acétamide (CDEPA) et le diéthylaniline (DEA), peuvent tous les trois réagir avec l'ADN pour former des adduits, ceci est confirmé dans un essai *in vitro* dans lequel l'adduction par le CDEPA atteint $118 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ d'ADN et par l'alachlore $2898,6 \text{ amol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ d'ADN, et la comigration avec des adduits poly dG et poly dT indique que l'alachlore se lie avec la guanine, alors que le CDEPA avec la guanine et la thymine ; ce métabolisme est le mécanisme le plus probable pour la mutagénicité et la carcinogénicité de l'alachlore (Nelson et Ross, 1998). Des cassures monobrin et des adduits à l'ADN proportionnels aux doses sont mesurés dans le foie, les reins et les poumons de souris administrés de dazomet avec des concentrations allant jusqu'à $90 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$, ces adduits atteignent 60, 48, et 22 adduits par 10^9 nucléotides dans chaque organe respectivement (Peluso *et al*, 1998). La dose de $5 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de méthomyl analytique pur ne produit pas d'adduits dans les tissus hépatiques des souris, mais une augmentation des 8-OH-dG, alors que cette même dose de « Lannate 25 », formulation commerciale avec 25 % de méthomyl, exerce le même stress oxydatif et entraîne en plus la formation de six différents adduits à l'ADN proportionnels aux doses ; cette génotoxicité proviendrait d'un composant de la formule technique ou de l'effet combiné du méthomyl avec un de ces composants (Bolognesi *et al*, 1994). La diphénylamine ($0,09\text{-}1,4 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$) et le chlorothalonil ($0,13\text{-}1 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$) induisent une augmentation de 8-OH-dG proportionnellement à la dose appliquée, alors que 13 autres matières actives testées dans les mêmes conditions, ne causent pas un stress oxydatif (benomyl, procymidone, méthidathion, chlorpyrifos-éthyle, parathion-méthyle, chlorpropham, parathion, vinclozolin, chlorfenvinphos, pirimiphos-éthyle, thiabendazole, fénarimol) (Lodovici *et al*, 1997). Aucun adduit à l'ADN n'est obtenu chez les souris suite à des administrations de chlordane, pourtant inducteur de tumeurs, et ceci dans des expérimentations de toxicité chronique et aigue (Whysner *et al*, 1998). Le carbamate carbaryl, l'organophosphoré quinalphos, le benzimidazole benomyl et le carbendazim, son métabolite, sont tous également cytotoxiques envers des cultures de cellules animales (de rat) et humaines (hépatiques) et induisent la voie métabolique dépendant du CYP1A1/2 ; leur action est réduite par le glutathion (Dierickx, 1999). Le N-{2-[4—(2,2-éthylènedioxy-1-cyclohexylméthyle)-phénoxy]éthyle}carbamate (W328) est cytotoxique envers des cellules humaines entre 0,1 et 100 ppm, entraîne une réduction de la concentration cellulaire en ATP, des effets négatifs sur la morphologie des cellules et du noyau et sur la multiplication cellulaire par arrêt de la mitose après un jour d'exposition ; pourtant le W328 est un juvénoïde, et ceux-ci sont caractérisés par une action hautement ciblée et un faible impact environnemental (Forman *et al*, 2002).

Cette liste présentée ci-haut, loin d'être exhaustive, indique que la génotoxicité des pesticides peut varier de l'absence complète (toxaphène, méthomyl, chlordane) à une action plutôt prononcée (azinphos-méthyle, pentachlorophenol, lindane, endosulfan, alachlore, et autres), avec toutes les matières actives intermédiaires ; démontrant la corrélation parfaite ou complètement absente entre génotoxicité et carcinogénicité d'une part, et mettant en évidence d'autre part la diversité des moyens que les pesticides utilisent pour exercer leur toxicité. Et finalement, génotoxicité ou cytotoxicité ou encore écotoxicité, le risque n'est pas moindre ni la toxicité.

3.5. Interaction pesticides-levures

3.5.1. Cytotoxicité et génotoxicité

La membrane plasmique des levures est le site d'action de nombreux antifongiques qui vont soit se complexer aux stérols soit inhiber la synthèse de l'ergostérol et entraîner ainsi une désorganisation de la structure membranaire, et par la suite, un déséquilibre dans les échanges de la levure avec le milieu environnant ; suivi par différentes perturbations tel qu'une accumulation d'acides gras libres, une inhibition de la respiration et de la synthèse des acides nucléiques accompagnée par une augmentation du poids sec et des déformations morphologiques notables (Buchenauer, 1987 ; Bonaly, 1991 ; Hargreaves *et al*, 1996). Or, à part leur fonction de barrière de

perméabilité entre l'intérieur et l'environnement et la maintenance de la structure cellulaire, les membranes sont le milieu naturel de plusieurs protéines fonctionnelles essentielles au fonctionnement cellulaire. Ainsi, la grande accumulation de faibles concentrations de xénobiotiques lipophiles présents dans le milieu peut provoquer une altération des propriétés fonctionnelles des membranes, qui peut à son tour avoir des conséquences néfastes très sévères sur la cellule en entier, mise à part la possibilité d'une réaction du toxique avec les composants intracellulaires du cytoplasme ou du noyau. Or, cette dernière possibilité est souvent à ne pas sous estimer, la toxicité des pesticides pouvant s'exercer directement envers des composants intracellulaires levuriens de différents compartiments cellulaires ; des actions cytotoxiques et génotoxiques diverses viennent alors s'ajouter et se combiner (Ahlers *et al*, 1991 ; Goin et Mayer, 1995 ; Wang *et al*, 2002 ; Sohn *et al*, 2004).

Par ailleurs, l'estimation du danger environnemental et sanitaire de plus de 100000 substances chimiques fabriquées par l'Homme, sans augmenter l'expérimentation avec les animaux supérieurs, implique logiquement la combinaison de plusieurs méthodes, tel que les tests utilisant des microorganismes. Pour toutes leurs caractéristiques physiologiques, génétiques et techniques déjà citées, les levures sont parmi les meilleurs modèles proposés, et leur utilisation dans ce domaine est déjà très courante.

Utilisées dans cette optique, cinq espèces différentes parmi lesquelles plusieurs souches de *Saccharomyces cerevisiae*, ont manifesté une sensibilité élevée envers le penconazole, le cymoxanil et le dichlofluanide, et ceci pour une gamme de concentrations variant entre 5 et 100 mg.L⁻¹ pour les deux premiers, 0,2 et 6 mg.L⁻¹ pour le dernier (Ribeiro *et al*, 2000). L'addition des fongicides au cours de la phase exponentielle de croissance n'entraîne aucun effet négatif alors que l'apport réalisé avant l'inoculation affecte le taux de croissance, la quantité finale de biomasse produite et le taux de respiration ; le changement d'un substrat fermentescible (glucose) à un autre respiratoire (acide acétique) augmente l'effet négatif chez les levures autres que *Saccharomyces*. Par ailleurs, Ueda *et al* (2003) indiquent que 10 mM de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) suffisent pour diminuer l'activité de la catalase de *Candida tropicalis* au dessous du dixième par rapport au témoin, sans toutefois affecter sa formation dans le cytosol, son transport et son agrégation dans les peroxisomes ; 3-AT est un inhibiteur spécifique de la catalase par liaison covalente avec le site actif de l'enzyme. Aussi, les herbicides 2-méthyle-4-chloro acide phénoxyacétique (MCPA) (0,005-4,75 mM) et 2,4-dichloro acide phénoxyacétique (2,4-D) (0,1-1 mM) provoquent une forte inhibition des cinétiques de croissances et une augmentation de la phase de latence chez *S. cerevisiae* (Cabral *et al*, 2003). Cette toxicité dépend du pH du milieu, donc de la forme liposoluble non dissociée de ces herbicides acides, aussi de l'état physiologique des cellules et de la taille de la population exposée au toxique. Les cellules inadaptées préalablement au pesticide, mais exposées en début de leur phase de croissance exponentielle sont les plus sensibles au toxique et présentent la plus grande mortalité, par comparaison avec les cellules exposées en ralentissement de croissance ou en phase stationnaire, qui sont plus résistantes. L'influence du nombre de cellules viables n'est pas moindre ; effectivement, pour une population plus nombreuse, on note une augmentation de la concentration minimale inhibitrice. Dans tous les cas testés, la perte de viabilité est de court terme, après laquelle les cellules s'adaptent au toxique et recommencent à se multiplier malgré sa présence (Cabral *et al*, 2003). Toujours avec *S. cerevisiae*, sa croissance est inhibée proportionnellement aux doses croissantes (0-10 µM) de tributyltin ; cependant, après une heure d'exposition à 0,5 µM de ce biocide, la teneur cellulaire en tributyltin atteint 4,5 nmol.10⁹cell⁻¹ (Masia *et al*, 1998). Et aussi, le thiuram, le captane, le zinèbe et le ziram influencent la conjugaison des cellules du type a de cette levure avec le conjuguant α, une diminution de l'efficacité de la conjugaison accompagne l'augmentation de la dose appliquée ; ceci est utilisé comme biomarqueur des effets toxicologiques des pesticides sur la transduction du signal des phéromones impliquées dans la reproduction sexuée de *S. cerevisiae*, et par extension, celui des mammifères (Fujita *et al*, 2003). Le DDT (0,5 ppm), le fénitrothion (1,5 et 10 ppm) et le chlorpyrifos (1,5 et 10 ppm) inhibent la croissance de *S. cerevisiae* jusqu'à 33 %, 42 %

et 78 % respectivement par rapport au témoin, mais cette inhibition est maximale au début du traitement, elle diminue progressivement à partir de 12 heures de contact pour disparaître complètement après 24 heures. Les cellules reprennent donc un fonctionnement normal malgré la présence des molécules toxiques dans le milieu et recommencent à se multiplier (Lal et Lal, 1987). Plusieurs phénols, anilines et alcools aliphatiques inhibent la croissance de *S. cerevisiae*, leur effet sur les membranes biologiques est néfaste, l'activité de l'ATPase membranaire et le transport de purine se trouvent altérés, et les effets observés sont proportionnels aux degrés de liposolubilité des substances testées. Ces composés forment une classe importante de substances chimiques lipophiles environnementales à utilisations diverses, on en trouve beaucoup parmi les pesticides ; leur accumulation dans les bicouches lipidiques des membranes pourrait être, dans certains cas, la raison majeure de leur toxicité (Ahlers *et al*, 1991). Aussi, d'après leur toxicité vis-à-vis de *S. cerevisiae*, 24 dérivés nitrobenzène souvent utilisés comme herbicides ou insecticides, peuvent être divisés en mononitrobenzènes et dinitrobenzènes ; l'action toxique des premiers dépend de leur processus de pénétration dans la cellule d'une part, donc de leur solubilité dans les membranes ou leur hydrophobicité, et de leur réactivité avec des sites cibles d'autre part ; alors que les deuxièmes présentent une toxicité supérieure et uniquement électrophile les impliquant dans des interactions avec les macromolécules structurales riches en électrons (Wang *et al*, 2002).

Le traitement de *S. cerevisiae* par l'endosulfan engendre des dégâts oxydatifs, il en résulte une inhibition de la croissance et de la respiration cellulaires positivement corrélée à la dose appliquée, et qui peut être remédiée par l'apport d'antioxydants tel que l' α -tocophérol ou la β -carotène. La toxicité de l'endosulfan serait alors étroitement associée à l'induction de la génération d'espèces oxygénées réactives (ROS). En effet, lorsque les cellules sont exposées à 250 μ M d'endosulfan pendant cinq heures, la génération de ROS augmente de 410 % par rapport aux cultures témoins démontrant d'un stress oxydatif sévère ; une dose supérieure d'endosulfan (500 μ M) ne permet plus la mesure correcte des ROS générés à cause d'une grande perte de la viabilité. Quant à la croissance, elle se trouve réduite de 84 % par rapport au témoin après neuf heures de culture en présence de 100 μ M d'endosulfan, cependant cette inhibition disparaît partiellement à partir de 22 heures de contact avec le pesticide suggérant une adaptation de *S. cerevisiae* à ce dernier ou sa détoxification (Sohn *et al*, 2004).

Parmi 22 benzimidazoles testés (Goin et Mayer, 1995), six composés induisent une perte de chromosome (CHRL) chez *S. cerevisiae*, ce sont le mebendazole (17,5 ppm, CHRL=152 par 10^6 UFC), l'albendazole (30 ppm, CHRL=152 par 10^6 UFC), le RS-9237-000 (62,5 ppm, CHRL=152 par 10^6 UFC), le fenbendazole (25 ppm, CHRL=152 par 10^6 UFC), le 2-benzimidazolylacétonitrile (non déterminé ND) et le thiabendazole (120 ppm, CHRL=152 par 10^6 UFC) ; cette perte de chromosome s'accompagne d'une inhibition de la croissance levurienne de 75 %, 91 %, 64 %, 98 %, ND, 95 % respectivement. Cet effet est plus prononcé dans des milieux de cultures assurant une bonne solubilité de ces substances très hydrophobes. Le thiabendazole est donc le plus fort inducteur de CHRL, ce fongicide est très utilisé pour les traitements pré et post-récolte, il est sujet de nombreuses études de toxicité et présente partout une forte activité CHRL, ainsi que le benomyl, et le méthyle-2-benzimidazolecarbamate (Albertini, 1990).

Ces effets divers de cytotoxicité et génotoxicité s'accompagnent souvent par une altération globale des fonctions levuriennes ; et tout comme la croissance ou la respiration cellulaires l'activité fermentaire se trouve aussi modifiée.

Dans une tentative d'évaluer la toxicité des pesticides envers les levures de vinification, plusieurs matières actives utilisées dans les traitements chimiques de la vigne ont été testées (dichlofluanide, mancozèbe, captane, folpet, phosétyl-aluminium, curzate, cuivre, iprodione, manèbe, zinèbe, benomyl, thiophanate-méthyle, méthidation, phosalone, vinclozolin, procymidone, méthomyl et soufre), et seuls le méthomyl, dans sa formule technique « lannate », et le soufre n'affectent pas la croissance des colonies des levures de fermentation sur gélose. Toutes les autres substances inhibent cette croissance pour toutes les levures testées parmi lesquelles *Saccharomyces*

cerevisiae et *Metschnikowia pulcherrima*, et ceci pour la dose (D) habituellement pulvérisée sur la vigne lors des traitements adéquats, et aussi pour des doses inférieures allant jusqu'à D/1000 (Monteil *et al*, 1986).

En effet, il existe des incidences de certains produits phytopharmaceutiques sur les cinétiques fermentaires, sur la microflore des raisins et sur la composition et la qualité du vin, principalement lorsque les doses appliquées et les délais de carence ne sont pas respectés (Cuinier, 1996). Des mauvais départs, des ralentissements et même des arrêts de fermentation ont accompagné l'emploi de plus en plus courant des pesticides, ceux-ci ayant de fortes propriétés anti-levuriennes (Monteil *et al*, 1986). La toxicité des résidus de produits chimiques tels les phthalimides, les phénols, les triazoles, les organophosphorés, contre les levures résulte en une altération de leur capacité fermentaire, les pyrimidines et les dithiocarbamates semblent moins corrélés à ce problème (Dubernet *et al*, 1990). Le folpet, le captane, le captafol le thiophanate-méthyle, le fénarimol et le dichlofluanide, entraînent un prolongement du temps de latence aux teneurs résiduelles (1, 2, 5 et 10 mg.L⁻¹), tandis que les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols agissent sur la fin des cinétiques fermentaires qui vont traîner, et pour des teneurs élevées en résidus, s'arrêter (Mezieres *et al*, 1988 ; Cuinier, 1996 ; Cabras et Angioni, 2000). Cependant, les levures peuvent se montrer résistantes à la présence de résidus de pesticides ; ainsi, l'application des six fongicides suivants : azoxystrobin, cyprodinil, fludioxonil, mepanipirim, pyrimethanil et tétraconazole sur les moûts à des doses dépassant leurs LMRs (comprises entre 1,5 et 10 LMR) n'a pas affecté l'activité fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae* et *Kloeckera apiculata*, et ces levures n'ont présenté aucune adsorption ou dégradation des matières actives citées (Cabras *et al*, 1999). De même avec le triadimenol, ajouté dans le jus à des concentrations allant jusqu'à 0,5 mg.L⁻¹, la fermentation alcoolique a été normale et les caractères organoleptiques du produit obtenu ont demeuré inchangés (Pilone, 1986).

Actuellement, tous ces éléments sont pris en considération par les comités d'homologation et les nouvelles matières actives peuvent être commercialisées seulement après avoir fait preuve d'innocuité envers les levures fermentaires, et certaines molécules ont été interdites (Cuinier, 1996 ; Cabras et Angioni, 2000). Toutefois, l'incidence grave des pesticides vis-à-vis de la fermentation levurienne reste la modification qualitative et quantitative de la niche écologique des levures et bactéries colonisant les fruits ; car si l'effet d'empoisonnement direct est facilement maîtrisable, la transformation de la microflore naturelle est beaucoup plus difficile à rattraper, et les accidents auraient lieu sans qu'il y ait présence simultanée dans le milieu de fermentation de résidus de pesticides (Dubernet *et al*, 1990 ; Cuinier, 1996).

3.5.2. Bioaccumulation et dégradation

Récemment, l'aptitude des microorganismes à accumuler et/ou métaboliser certains pesticides a été le centre d'attention à cause de la persistance environnementale et la toxicité de ces substances chimiques. Une variété de microorganismes peuvent utiliser les pesticides comme source unique de carbone ; cependant, dans certains cas ce métabolisme microbien des contaminants peut produire des métabolites toxiques, et souvent l'adsorption se présente comme le choix le plus prometteur. Ce mécanisme implique des processus indépendants du métabolisme tel que l'adsorption physique et chimique, l'échange d'ions, l'interaction électrostatique, la complexation, la chélation et la microprécipitation. Ces réactions se déroulent dans la paroi et la membrane cellulaires, contrairement aux biotransformations qui mettent en œuvre le métabolisme aérobie ou anaérobie (Aksu, 2005).

La taille des cellules, leur morphologie et composition chimique, ainsi que le nombre et la distribution des sites actifs d'adsorption jouent un rôle déterminant dans la capacité d'adsorption (Aksu, 2005). La concentration du toxique dans la membrane plasmique peut être plusieurs fois supérieure à sa concentration dans le milieu extérieur et dans les compartiments intracellulaires hydrophiles (Ahlers *et al*, 1991).

Saccharomyces cerevisiae cultivée dans des milieux additionnés de 0,01, 0,1 et 0,5 ppm de DDT et de 1,5 et 10 ppm de fénithrothion et chlorpyrifos est capable d'effectuer une bioaccumulation et une métabolisation de ces pesticides, mais seulement le DDD et le DDE ont été identifiés. La bioaccumulation réalisée est inversement proportionnelle à l'hydrosolubilité de ces substances ; pour le DDT, l'accumulation est linéairement corrélée à la concentration initiale de l'insecticide, le maximum d'accumulation ($8,25 \mu\text{g.g}^{-1}$) est atteint en deux heures de contact, suivi par un déclin de la concentration du DDT avec l'augmentation de la biomasse levurienne. Le fénithrothion et le chlorpyrifos présentent le même profil d'accumulation avec des maximums de $18,96 \mu\text{g.g}^{-1}$ et $11,58 \mu\text{g.g}^{-1}$ respectivement. L'augmentation de la biomasse est si rapide que l'accumulation par unité de biomasse diminue au cours du temps malgré la bioaccumulation ininterrompue (Lal et Lal, 1987). Le folpet est aussi adsorbé sur les membranes de *S. cerevisiae* en raison de sa liposolubilité ; pour des fortes concentrations, seul le folpet est retrouvé dans le milieu de culture, alors que pour les faibles concentrations, le folpet est biotransformé. En effet, une concentration seuil du folpet ($6,7 \cdot 10^{-8} \text{ mg.cell}^{-1}$) détermine le passage d'une adsorption à une dégradation ; pour des concentrations inférieures on commence à détecter du phthalimide, son métabolite, dans le milieu de culture. Le taux de biodégradation est donc inversement proportionnel à la concentration du folpet dans le milieu, il atteint un maximum de 90 % pour les concentrations les plus faibles. Le folpet serait lié à des protéines membranaires par des ponts disulfure, et lorsque tous les sites de liaison sont occupés, la levure est inactive vis-à-vis de l'adsorption, et la concentration seuil sera le point auquel la cellule passe d'un rôle passif à un autre actif dans la décomposition du folpet (Viviani-Nauer *et al*, 1997).

Par ailleurs, une biodégradation des herbicides simazine, atrazine, cyanazine, ametryn et prometryn est réalisée par la levure du sol *Lipomyces starkeyi* ; ces herbicides triazines sont des substances azotées hétérocycliques, et leur assimilation comme source exclusive d'azote constitue une dépollution du sol (Nishimura *et al*, 2001).

Les juvénoïdes représentent une classe de pesticides relativement récente qui régule la reproduction des insectes et leur développement. La souche T₁ de *Candida* est capable de croître en utilisant le N-{2-[4—(2,2-éthylènedioxy-1-cyclohexylméthyle)-phénoxy]éthyle} carbamate (W328) comme source de carbone et le transforme majoritairement en W329, son dérivé cétonique. 10 % du produit initial sont convertis en sept jours de culture ; le W329 est moins toxique que le W328, il a perdu son activité contre la reproduction des insectes (Forman *et al*, 2002). La présence de 1 % et 2 % de glucose dans le milieu de culture stimule la biodégradation de 30 %, et un suivi prolongé étalé sur huit semaines indique que la plus grande activité de dégradation a lieu pendant la première semaine, ensuite la baisse du rendement serait due à l'accumulation des produits et à l'état physiologique épuisé des cellules pendant une aussi longue période de culture (Novák *et al*, 2003).

Le malathion (500 ppm) est dégradé enzymatiquement par l'estérase levurienne dans un système *in vitro* ; une diminution de 35 % de la concentration est notée après deux jours de traitement accompagnée par la formation de malathion monoacide (MMA), majoritaire, et de malathion diacide (MDA), en moindre quantité. Le contrôle de la toxicité des métabolites par un système bactérien, révèle une toxicité très élevée du MMA, causant des dégâts membranaires et une inhibition de la synthèse protéique tout comme le malathion, alors que le MDA est non toxique (Kim *et al*, 2005).

Pour conclure, on peut noter qu'en matière d'interaction avec les pesticides, le modèle levurien se montre comme un système approprié pour répondre à nombreuses hypothèses de cytotoxicité et génotoxicité directe ou indirecte. Ainsi, perturbation des systèmes membranaires, inhibitions enzymatiques, stress oxydatif, perte de chromosome, métabolites réactionnels électrophiles, et autres actions cytotoxiques et/ou génotoxiques sont relevés parallèlement à la baisse de la viabilité et la diminution de la croissance et de l'activité fermentaire des levures sous l'effet des pesticides. Donc, les levures peuvent être passives et subir l'action toxique, comme elles pourraient participer à cette toxicité par bioactivation des pesticides en métabolites réactifs électrophiles

présentant une forte probabilité de liaison avec les macromolécules structurales et résultant en adduits, à l'exemple du métabolisme levurien de l'aflatoxine B₁ et du BaP. Donc, là aussi le métabolisme peut jouer un rôle crucial qui peut être nuisible, ou protecteur lorsque les métabolites obtenus sont moins toxiques que le pesticide initial.

Mais, si les pesticides exercent une action toxique envers les levures, ces dernières peuvent à leur tour diminuer les résidus de pesticides par adsorption et/ou métabolisation des molécules toxiques.

Cette vue d'ensemble ne peut que souligner l'efficacité du modèle levurien pour définir les bases cellulaires et moléculaires de la toxicité des pesticides.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel chimique

Les pesticides testés sont choisis parmi ceux communément utilisés pour les traitements phytosanitaires des fruits au Liban. Six matières actives ont été adoptées de manière à avoir différentes classes représentées ; ce sont des standards analytiques (Riedel-de Haën, Allemagne) dont la pureté dépasse 99%.

Pour la validation du modèle cellulaire afin de servir comme test dans les études de génotoxicité, deux toxiques de référence en matière de formation d'adduits à l'ADN ont été testés, ce sont le benzo(a)pyrène et l'Aflatoxine B₁. Les standards analytiques utilisés sont fournis par Acrös Organics.

Les solutions mères (1000 mg.L⁻¹) sont préparées dans l'éthanol et celles utilisées pour l'analyse chimique dans l'hexane. Tous les solvants utilisés sont de pureté chromatographique (Fluka, HPLC grade).

L'éthanol étant toxique envers les levures (Charpentier, 1993; Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996), les solutions ont été préparées de sorte que la proportion d'éthanol fournie au milieu ne dépasse pas 1% (v/v). Donc, en cas où la croissance des levures ou leur activité fermentaire sont affectées, ceci est dû exclusivement à la présence des pesticides.

Les molécules ainsi que certaines de leurs caractéristiques et indices toxicologiques sont donnés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques des pesticides testés (FAO/OMS, 1994; Geahchan et Abi Zeid Daou, 1995) :

Matière Active	famille Chimique	Classe selon la cible	Propriétés	LMR (mg.kg ⁻¹)	DL ₅₀ (mg.kg ⁻¹)	Solubilité (mg.L ⁻¹)	Délai de carence (jours)
Azinphos-méthyle	Organophosphoré	Insecticide	Contact Ingestion	2	20	33	15
Bénomyl	Carbamate	Fongicide	Systémique	2	>10000	2	-
Chlorpyrifos-méthyle	Organophosphoré	Insecticide	Contact Ingestion Inhalation	0,5	2140	4	21
Cyhéxatin	Organostannique	Acaricide	Contact	2	540	<1	30
Diméthoate	Organophosphoré	Insecticide	Systémique	1	320	25000	7
Penconazole	Triazole	Fongicide	Systémique	0,2	2125	70	15

2. Matériel biologique

Une souche de *Saccharomyces cerevisiae* et une souche de *Metschnikowia pulcherrima* ont été fournies par la « Mycothèque de l'Université de Louvain » (Belgique), où elles sont respectivement répertoriées sous les numéros MUCL 31497 et MUCL 29874.

Ces 2 souches ont été conservées à 4°C et repiquées tous les 4 mois sur une gélose YPDA (10 g.L⁻¹ de glucose [Himedia], 10 g.L⁻¹ d'extrait de levure [Himedia], 10 g.L⁻¹ de bactopeptone [Oxoid] et 20 g.L⁻¹ d'Agar [Himedia]).

3. Test de toxicité pesticides – levures

10 mL de gélose YPDA ont été répartis dans les boîtes de Pétri. Chacune d'elles a ensuite reçu un apport de la solution de pesticide de manière à obtenir les concentrations 20 LMR, 10 LMR et 5 LMR pour chaque matière active.

Un témoin est réalisé avec le milieu stérile exempt de pesticides : il sert à suivre le développement normal des levures. Un triplicat est réalisé pour chaque concentration testée et pour le témoin.

Les cultures « mère » des deux levures ont été préparées dans un milieu synthétique YPD (25 g.L⁻¹ de glucose [Himedia], 10 g.L⁻¹ d'extrait de levure [Himedia] et 10 g.L⁻¹ de bactopeptone [Oxoid]), agitées à 150 rotations / minute pendant 24 heures à 28 °C, ensuite ajustées avec de l'eau physiologique (0,85 % p/v) à 10³ cellules. mL⁻¹. Un volume de 100 µL est alors prélevé et étalé sur chaque boîte de Petri.

Ce test a été répété une deuxième fois d'une manière indépendante (avec deux nouvelles cultures).

Le pourcentage d'inhibition a été obtenu par la relation $100 \cdot (N_t - N_{pc}) / N_t$ où N_t représente le nombre des colonies du témoin, N_{pc} celui de la boîte contaminée par le pesticide « p » à la concentration « c ». Les concentrations inhibitrices de la croissance de 50 % des colonies (IC₅₀) ont été estimées à l'aide du logiciel « Curve Expert » en portant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration du pesticide.

Ce test constitue un screening fournissant une première évaluation de la toxicité et des doses toxiques des pesticides envers les 2 levures, toute influence relevée peut correspondre à la possibilité d'empêcher ou de gêner l'action de ces dernières au cours des cultures ultérieures (Monteil *et al*, 1986).

A l'issue de ce test, une seule matière active, celle qui exerce la plus grande inhibition sur la croissance des colonies, a été choisie afin de servir pour les différentes études qui suivent.

4. Etude préliminaire de toxicité

Les premières cultures ont été réalisées dans des conditions simulant le processus de fermentation spontanée dans le but d'étudier l'incidence des résidus de pesticide sur les cinétiques de croissance et de fermentation des levures en milieu naturel. Cette étude a été couplée à une analyse des résidus de pesticide afin de clarifier la cinétique d'évolution de la molécule toxique : sa persistance dans le milieu et l'aptitude éventuelle des levures à la prélever.

4. 1. Cultures

Les expériences ont été réalisées à 25 °C dans des ballons jaugés de contenance 1 L, de volume utile 800 mL.

Le milieu de culture est un moût de pomme Starking issu de culture biologique (123 g.L⁻¹ de fructose, 59 g.L⁻¹ de glucose et 13 g.L⁻¹ de saccharose et de pH 4,5) et pasteurisé (une heure à 70 °C).

Chaque ballon reçoit un apport du pesticide sélectionné à partir du test de toxicité selon les concentrations correspondant à 10 LMR, 5 LMR, 2 LMR et 1 LMR et est ensuite inoculé par une culture préparée dans le même milieu (150 rotations / minute pendant 24 heures à 28 °C). Le taux d'inoculation est de $5 \cdot 10^6$ cellules.mL⁻¹ (cellules viables).

Un ballon exempt de pesticide permettant de suivre le déroulement normal de la fermentation a été gardé comme témoin. Pour chaque levure, un duplicat a été réalisé pour chaque concentration et pour le témoin.

Un suivi quotidien de la fermentation a été réalisé par une mesure de la teneur en sucres totaux, du pH et une évaluation de la biomasse par dénombrement des colonies sur milieu (YPDA) en surface. La population est donc exprimée en UFC.mL⁻¹ (ou « unités formant des colonies » par mL).

Des échantillons destinés aux dosages chimiques ont été prélevés après l'inoculation et tous les 4 jours au cours des cultures ; ils ont été conservés à -20 °C et décongelés à température ambiante au moment de l'analyse. Les résultats ont été soumis à l'analyse des variances à l'aide du logiciel Statistica.

4. 2. Analyse des sucres

Fructose, glucose et saccharose ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Le chromatographe utilisé (LKB 2150) est muni d'une colonne LC – NH₂ (waters) de longueur 25 cm, de diamètre interne 4,6 mm remplie par 5 µm de phase stationnaire; et d'un détecteur à indice de réfraction. Le tout est relié à un intégrateur C-R6A Chromatopac (shimadzu).

La phase mobile est formée par une solution d'acétonitrile à 83 % en volume dans l'eau distillée, le débit en mode isocratique est maintenu à 1,5 mL.min⁻¹. Le volume injecté est 20µl.

Le mélange standard est formé par 38 g.L⁻¹ de D (+) – fructose, 30 g.L⁻¹ de D (+) - glucose et 6 g.L⁻¹ de D (+) - saccharose. Réalisé en 5 dilutions, ce mélange a servi pour tracer la droite d'étalonnage.

Les échantillons ont été filtrés par des filtres de cellulose (millipore) de porosité 0,45 µm, ensuite dilués à une concentration adéquate pour chacun de sorte à le placer dans la zone de linéarité de l'étalonnage.

4. 3. Analyse de l'éthanol

La teneur en éthanol est mesurée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (Shimadzu GC 17A), munie d'une colonne remplie Carbowax 20M (Supelco) de 2 m de longueur et 2,1 mm de diamètre interne et d'un détecteur par ionisation de flamme ; le tout est relié à un intégrateur C – R6A chromatopac (Shimadzu).

La température de l'injecteur est 175 °C celle du four maintenue isotherme à 90 °C et celle du détecteur 200 °C. Le gaz vecteur est l'azote fixé à 20 mL.min⁻¹ de débit.

Le n-propanol a été utilisé comme étalon interne. La solution mère de calibration utilisée est composée de 10 % en volume d'éthanol et 10 % en volume de n-propanol, dont 5 dilutions successives ont servi à tracer la droite d'étalonnage.

Les échantillons ont été centrifugés à 5000 rpm pendant 15 min et ont subi la dilution nécessaire pour les placer dans la zone de linéarité de l'étalonnage.

4. 4. Analyse des résidus de pesticide

4. 4. 1. Préparation de l'échantillon et procédure d'extraction

La méthode d'extraction mise en oeuvre est celle proposée par Cabras (Cabras *et al*, 1999). Un échantillon de 5 mL est homogénéisé et ensuite centrifugé à 5000 rpm pendant 15 minutes pour séparer les levures du milieu de culture. Le culot obtenu par cette première centrifugation est mélangé avec 1 mL d'éthanol à 10% (v/v) et centrifugé une deuxième fois. Le surnageant obtenu est ajouté au premier. Culot et surnageant ont subi une extraction séparée : chacun est additionné de 5

mL d'hexane et agité sur agitateur rotatif pendant 30 minutes. Ensuite, après séparation des deux phases, 1 μL de la phase organique est injecté dans le chromatographe.

4. 4. 2. Dosage des résidus

Ce dosage est également réalisé par chromatographie en phase gazeuse (Shimadzu GC 17A) sur colonne capillaire PTE-5 (Supelco; longueur 30 m, diamètre interne 0,53 mm, phase stationnaire de 0,25 μm d'épaisseur) avec une détection par capture d'électrons. Le tout est relié à un ordinateur ayant un logiciel spécifique (class - GC 10).

La température de l'injecteur est 280 °C, la colonne est soumise à un gradient de température allant de 140 °C à 265 °C avec une vitesse de 10 °C.min⁻¹, le détecteur est maintenu à 310 °C. Le gaz vecteur est l'azote (15 mL.min⁻¹). Le volume injecté est de 1 μL .

Les solutions standards sont injectées à plusieurs concentrations pour déterminer la limite de détection, le temps de rétention, le taux de récupération et pour tracer la droite d'étalonnage correspondant à la molécule étudiée.

5. Etude de cytotoxicité et génotoxicité

Dans une deuxième étape, le travail a été effectué dans un milieu semi synthétique afin de s'affranchir des fluctuations de la matière première naturelle et de permettre la mise en œuvre de méthodes expérimentales non praticables avec le milieu naturel. Une recherche des adduits à l'ADN accompagne cette étude et ceci dans une tentative de chercher plus loin le devenir de la molécule toxique et de corrélérer les effets observés sur le comportement cellulaire à une action directe du toxique contre l'ADN cellulaire. Cette étape comprend deux parties :

- Evaluation de la cytotoxicité et la génotoxicité du penconazole
- Validation du modèle cellulaire étudié

5. 1. Cultures

5. 1. 1. cultures fermentaires

Les expériences ont été réalisées à 30 °C dans des bouteilles (Simax) de contenance 2 L, de volume utile 1600 mL (250 rotations / minute).

Le milieu de culture utilisé est semi synthétique (50 g.L⁻¹ de glucose extra pure [Riedel-de Haën], 5 g.L⁻¹ de KH₂PO₄ [Merck], 2 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ [Merck], 0,4 g.L⁻¹ de MgSO₄.5H₂O [Scharlau] et 1 g.L⁻¹ d'extrait de levures [Bio Basic]) défini par Strehaiano (1984).

La préparation de l'inoculum (250 rotations / minute à 30 °C) se fait dans le même milieu, en 2 étapes : La première permet de stabiliser la souche vis-à-vis du milieu et la deuxième est utilisée pour ensemercer le milieu à étudier à 3×10^6 cell.mL⁻¹ en fin de phase de croissance.

Le penconazole a été additionné selon deux modes d'application différents :

- *Apport avant inoculation*

Des doses variant de 1 à 15 fois la LMR ont été apportées au milieu de culture avant l'inoculation.

- *Apport au cours de la croissance*

Une dose correspondant à 10 LMR du pesticide a été apportées à différents moments de la croissance des deux levures : au début de la phase exponentielle de croissance (après 4 h de l'inoculation), en cours du ralentissement (12 h) et en phase stationnaire (24 h).

Pour la validation du modèle cellulaire, le benzo(a)pyrène et l'Aflatoxine B₁ ont été testés dans les mêmes conditions de travail et suivant les deux modes d'application cités plus haut, pour les deux doses : 0,2 et 2 ppm correspondant respectivement à la LMR et 10 LMR du penconazole.

Un milieu témoin, exempt de toxique, a été toujours gardé afin de suivre le déroulement normal des cultures.

Un suivi des cultures a été réalisé par une évaluation régulière de la biomasse, et des échantillons destinés à l'analyse moléculaire pour la recherche des adduits à l'ADN ont été prélevés; ils ont été conservés à -20 °C jusqu'au moment de l'analyse.

5. 1. 2. Essai en respiratoire

L'expérience a été réalisée à 30 °C dans un fermenteur Inceltech (Séries 210) de contenance 5 L, de volume utile 1500 mL (500 rotations / minute). Un courant d'air stérile dans le milieu de culture (tableau 3) permet l'apport d'oxygène. Le milieu est alimenté avec une solution d'alimentation (tableau 3), dont le débit est réglé (pompe péristaltique Gilson) en fonction du quotient respiratoire de façon à restreindre la levure au métabolisme respiratoire. La détection des gaz en sortie du réacteur est assurée par deux analyseurs spécifiques pour la détection de l'O₂ (Servomex 4100) et le CO₂ (Servomex 1400).

Le B(a)P (0,2 ppm) a été additionné après 4 h de l'inoculation avec *S. cerevisiae* (300 * 10⁶ cell.mL⁻¹). Les échantillons destinés à l'analyse moléculaire pour la recherche des adduits à l'ADN ont été prélevés pendant deux heures après la contamination par le toxique; ils ont été conservés à -20 °C jusqu'au moment de l'analyse.

Tableau 3 : Composition du milieu de culture et de la solution d'alimentation

Composé	Pied de cuve	Bidon Alimentation
Glucose monohydraté	-	331 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	41,6 g	62 g
KH ₂ PO ₄	19,4 g	28,9 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,69 g	1 g
NaCl	1,39 g	2 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	16,65 g	24,78 g
Extrait de levures	0,75 g	1,1 g
Solution de minéraux	27,7 mL	41,3 mL
Solution de vitamines	27,7 mL	41,3 mL
Eau (q.s.p.)	1500 mL	2500 mL

5. 2. Evaluation de la biomasse levurienne

Deux méthodes ont été choisies pour évaluer la biomasse. Ces méthodes apportent des informations complémentaires qui augmentent la fiabilité de nos résultats. La numération/viabilité est fondamentale pour une approche qualitative de la population, mais elle n'est pas notoire pour sa précision pour déterminer le nombre de cellules. La densité optique, elle, est systématiquement plus

précise sur ce point. L'ensemble des mesures de la densité optique permet ainsi de prévisualiser l'allure de la courbe de croissance.

5. 2. 1. Méthode de numération/viabilité

La suspension cellulaire a été diluée jusqu'à $(20 \pm 5) \cdot 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$. Ensuite, elle a été mélangée volume à volume avec une solution de bleu de méthylène selon Pirth (0,1 g bleu de méthylène / L tricitrate de sodium 2 %). On laisse agir 10 minutes avant comptage microscopique (x 400) sur cellule de Thoma. Cette méthode a permis d'évaluer la concentration de levures et de recueillir des informations sur l'état physiologique des cellules (morphologie, bourgeonnement, aspect du cytoplasme, viabilité...).

Le nombre total de cellules présentes dans un volume donné d'échantillon a été compté. Il correspond à une concentration cellulaire donnée par :

$$\left(\frac{\text{nombre de cellules}}{\text{unité de volume}} \right) = \left(\frac{\text{nombre de cellules comptées}}{\text{volume du comptage}} \right) \times (\text{facteur de dilution})$$

Nous avons effectué le comptage des levures sur cellule de Thoma. Cette cellule est compartimentée par des « carrés » de $0,05 \times 0,05 \times 0,1 = 0,00025 \text{ mm}^3$. Chaque 16 « carrés » forment un « carreau ». Nous comptons 5 carreaux : les quatre de la diagonale allant du carreau supérieur gauche au carreau inférieur droit et le carreau supérieur droit (figure 7).

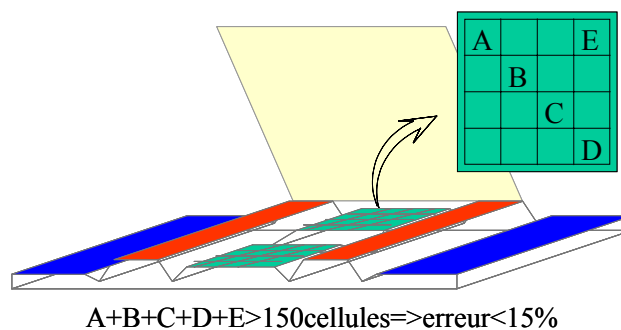


Figure 7 : Comptage sur cellule de Thoma

L'erreur sur la concentration cellulaire diminue lorsqu'on augmente le nombre de cellules comptées, tant que la densité des cellules permet un étalage sans superpositions sur la lame. On admet qu'une dilution menant à un comptage compris entre 150 et 250 cellules, donne une erreur relative inférieure à 15 % (Lange *et al*, 1993). En pratique, nous avons répété le comptage jusqu'à avoir un écart relatif inférieur à 10 % entre deux comptages consécutifs dont nous prenons la moyenne.

Les levures dites « viables » apparaissent claires. Les levures « mortes » se colorent en bleu. Dans la littérature, on distingue deux étapes dans le mécanisme de la coloration : dans la première étape, le passage à travers la membrane plasmique de la levure ne s'effectue que lorsque celle-ci devient déficiente (Chilver *et al*, 1978). Dans la deuxième étape, les hydrolases cytoplasmiques se chargent de la réduction du bleu qui pénètre dans la cellule, tant qu'elles sont fonctionnelles (Postgate, 1967). Cette méthode reste largement utilisée pour l'évaluation de la viabilité des levures (Bonora et Mares, 1982), en dépit de ses limites, comme sa surestimation du nombre des cellules non cultivables (Jones, 1987) : une cellule bleue pourrait en effet se rétablir, lorsque les conditions deviennent favorables.

5. 2. 2. Méthode de la Densité Optique

L'absorbance des échantillons frais convenablement dilués a été mesurée à 620 nm, avec un spectrophotomètre Shimadzu (UV mini 1240). Les cuves spectroscopiques utilisées sont en quartz (Hëllma) de trajet optique de 1 cm.

Une corrélation linéaire a été observée entre l'absorbance et le nombre de cellules pour des absorbances comprises entre 0,1 et 0,8. Au delà de la borne supérieure, les échantillons ont été dilués. La densité optique corrigée a alors été définie comme l'absorbance lue, que multiplie le facteur de dilution utilisé pour l'échantillon.

5. 3. Analyse des adduits à l'ADN par la méthode du post-marquage au phosphore 32

Le mode d'action des molécules génotoxiques implique en premier lieu l'interaction d'une molécule électrophile avec un site nucléophile de l'ADN produisant un adduit. Lequel peut en absence de réparation ou lors d'une réparation erronée provoquer une mutation et une altération de la fonction du gène. La détection des adduits à l'ADN s'avère donc utile pour la détection de composés génotoxiques et peut de plus servir comme biomarqueur d'effet biologique.

5. 3. 1. Produits utilisés

5.3.1.1. Les produits chimiques

Les produits chimiques utilisés sont "pour analyse". Le Phosphate de Sodium Dihydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), l'Urée, l'Hydroxyde de Lithium (LiOH), la soude, l' HCl , l'acide formique, l'acétate de potassium, le SDS (sodium dodécyl sulfate), l'isopropanol et l'éthanol sont commandés chez VWR International (Fontenay sous bois, France). La bicine, le chlorure de magnésium (MgCl_2), le DTT, la spermidine, le chlorure de sodium (NaCl), l'EDTA, le Tris, le Trizma base, la desferoxamine, le triton X-100, l'iodure de sodium (NaI) et le sucrose proviennent de Sigma (St Quentin Fallavier, France).

Le $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (6000 Ci/mme, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) provient d'Amersham Biosciences (Orsay, France). Le Roti-phénol (saturé en Tris-HCl) provient de Roth-Sochiel (Lauterbourg, France). La poudre de cellulose MN 301 vient de chez Macherey Nagel (Düren, Allemagne). La polyéthylène-imine (HCl à 5%) Corcat PEI P 600xE est fournie par CORCAT (Virginia Chemicals, Portsmouth, VA, USA).

5.3.1.2. Les enzymes

La phosphodiesterase bovine de rate (SPD) (P 9041), la nucléase de staphylocoque (MN) (N 3755), la protéinase K (P 6556), la ribonucléase T1 (RNase T1) d'*Aspergillus* (R1003) et la Ribonucléase pancréatique de boeuf (RNase A) (R 4875) sont fournies par Sigma chimie (St Quentin Fallavier, France). La nucléase P1 (236 225) (*Penicillium citrinum*) et la T4 polynucléotide kinase (R838 292) proviennent de Roche Diagnostic (Meylan, France).

5.3.1.3. Matériels de chromatographie

Les plaques de polyéthylène-imine cellulose (PEI) sont préparées au laboratoire. Les supports en plastique 130 cm \times 20 cm proviennent de chez France Plastics (Lyon, France). La cellulose de type MN 301 provient de chez Macherey Nagel (Düren, Allemagne).

Quatre-vingt grammes de cellulose sont mélangés à 58 ml d'une solution de polyéthylène-imine-HCl à 5 % et 600 ml d'eau distillée. L'étaleur (Desaga Heidelberg, Allemagne) sert à couler le mélange, après dégazage sous vide, sur les supports plastiques. Les plaques séchent à température ambiante pendant environ 16 heures. Elles sont ensuite découpées au format 18 cm × 26 cm, lavées au méthanol (1 minute) et rincées dans deux bains d'eau distillée puis séchées à température ambiante. Les plaques sont découpées aux dimensions 18 cm × 13 cm et sont stockées à -20 °C jusqu'à utilisation.

Certains laboratoires pratiquant la méthode de post-marquage utilisent des plaques de PEI cellulose commerciales provenant de chez Macherey-Nagel (Allemagne). Nous avons comparé les deux types de plaques lors de l'analyse d'un adduit standard de B(a)P. Les résultats sont présentés sur la figure 8.

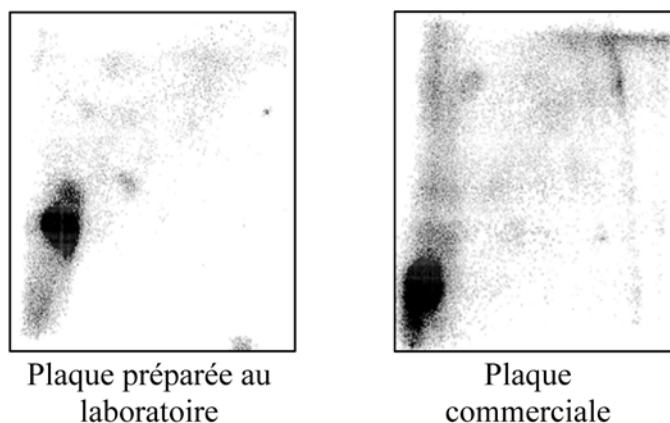


Figure 8 : Comparaison du post-marquage de l'adduit standard B(a)P sur deux types de plaques de PEI cellulose (Faucet-Marquis ; 2005)

Sur les plaques d'origine commerciale, l'adduit B(a)P a très peu migré, il est à peine séparé du point de dépôt de l'échantillon contrairement aux plaques du laboratoire. En outre, les plaques commerciales présentent un bruit de fond plus important que l'autre type de plaque. Ce bruit de fond peut interférer avec des adduits d'intérêt et gêner pour l'interprétation des résultats. De plus, il y a des variations de profil importantes d'un lot à l'autre. Nous avons donc choisi de travailler sur des plaques préparées au laboratoire.

Le papier Whatman No1 Chr provient de Whatman international Ltd (Maidstone, England). Pour les autoradiographies, on utilise des films de radiographie Kodak de 20 cm × 40 cm et de 30 cm × 40 cm, le révélateur Kodak LX24 et le fixateur Kodak AL4 à 20 % (Coradio, France). Les microtubes (1,5 et 2 ml) provenant d'Eppendorf (Hamburg, Allemagne), sont lavés au méthanol puis rincés deux fois à l'eau distillée avant utilisation.

5.3.1.4. Les adduits standards

L'adduit B(a)P provient de l'étude interlaboratoire "Interlaboratory standardization and validation of DNA adducts post-labeling methods for human studies" n° 5V0448 (Phillips et Castegnaro, 1999). Il est utilisé comme standard afin de contrôler le bon déroulement du post-marquage. Nous disposons d'une solution d'ADN adduité dont la concentration est de 110 adduits par 10^8 nucléotides normaux. Nous utilisons à chaque marquage 2 μ L de cette solution soit 4 μ g d'ADN.

Un contrôle négatif est réalisé lors de chaque post-marquage, il consiste à analyser un ADN dépourvu d'adduits. Nous utilisons pour cela une solution d'ADN de sperme de saumon

préalablement purifié. 2µL de cette solution, correspondant à 7µg d'ADN, sont marqués lors de chaque analyse.

5. 3. 2. Principe

La détection directe des adduits à l'ADN par la méthode du post-marquage au Phosphore 32 est une méthode fine et extrêmement sensible, qui permet de mettre en évidence le caractère génotoxique d'une substance.

Au laboratoire, nous utilisons une version modifiée de la méthode initiale (Randerath *et al*, 1981) qui permet d'atteindre une sensibilité de 1 adduit par 10¹⁰ nucléotides (Reddy et Randerath, 1986), avec des modifications (Pfohl-Leskowicz *et al*, 1993). Elle comporte les étapes suivantes (figure 9):

- Après extraction et purification de l'ADN, celui-ci est **hydrolysé** en désoxyribonucléosides 3'-monophosphate par deux enzymes, une endonucléase (nucléase de Staphylocoque) et une exonucléase (Phosphodiesterase de rate). A cette étape le milieu réactionnel contient un mélange de nucléotides normaux et modifiés (les adduits).
- On procède alors à une étape de **sélection des adduits**, cette étape est classiquement appelée par les initiateurs de cette méthode "enrichissement à la nucléase P1". Elle consiste, par l'activité 3'phosphatasique de la nucléase P1, à couper le phosphate en 3' des nucléotides normaux (Reddy et Randerath, 1986). Il s'agit d'une déphosphorylation sélective des désoxyribonucléotides normaux. La configuration structurale de l'adduit protège la liaison du phosphate en 3'et celui-ci sera donc conservé dans les adduits après cette étape.
- On réalise alors un **marquage enzymatique spécifique des adduits**. Seuls les 3'-P-nucléotides sont substrats de la polynucléotide kinase T4, qui a pour propriété de transférer un phosphate radioactif en position γ de l'ATP sur la position 5' du nucléotide. Ainsi, seuls les adduits sont marqués, les nucléosides normaux ne pouvant pas être phosphorylés n'interfèrent donc pas sur le marquage.
- Les nucléosides normaux et l'excès de phosphate inorganique sont séparés du ou des différents adduits par migration sur plaque de couche mince de polyéthylène-imine cellulose dans des solvants aqueux salins. Ceux-ci permettent la migration des substances hydrophiles, alors que les adduits qui sont hydrophobes restent au point d'origine, ou migrent légèrement suivant leur degré d'hydrophobicité.
- Les adduits sont alors séparés par **chromatographie bidimensionnelle échangeuse d'anions**, sur plaque de couche mince de polyéthylène-imine cellulose.
- Les adduits et leur emplacement sont visualisés par **autoradiographie** des plaques. Les autoradiogrammes obtenus deviennent le support du travail de l'analyse qualitative et quantitative. La radioactivité des plaques est scannée par un appareillage spécial (Bioimager) qui permet d'effectuer la quantification des spots radioactifs correspondant aux adduits de l'autoradiogramme grâce au logiciel *Ambis* (CSP incorporation, Billerica, USA).

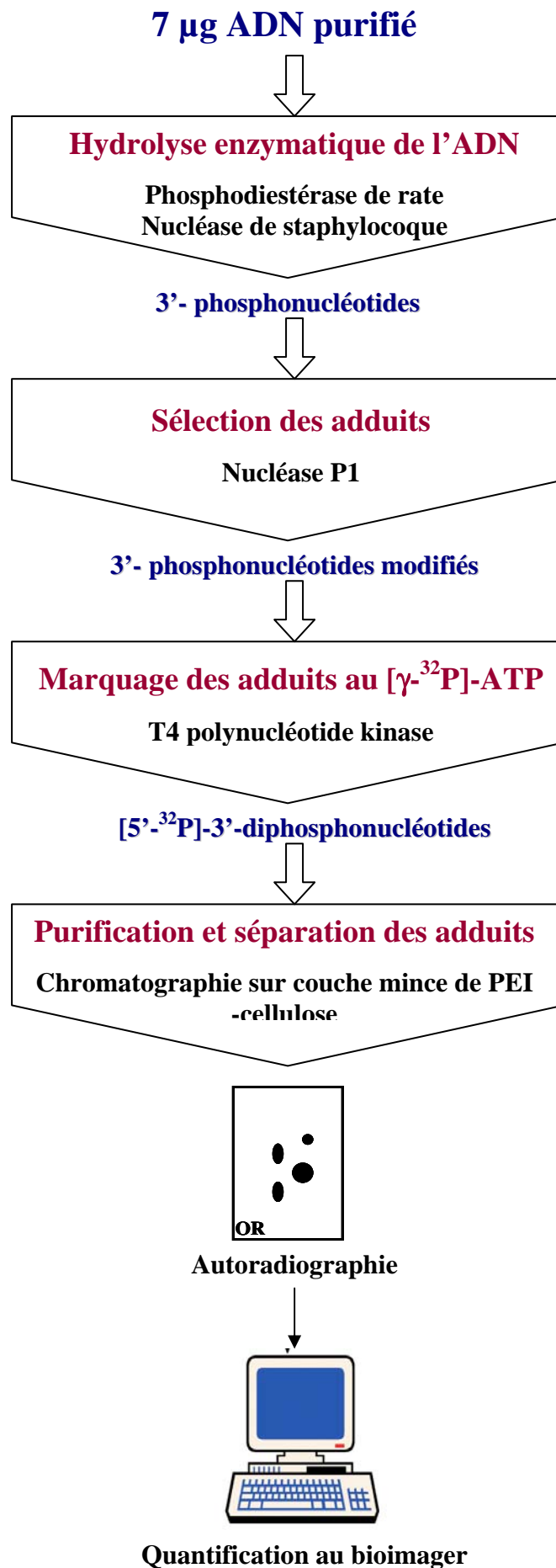


Figure 9 : Principe de la méthode du post-marquage au ³²P

5.3.3. Mise en place de points de contrôle

Des points de contrôle permettant de vérifier le bon déroulement de chaque étape ont été mis en place. Il s'agit de vérifier la pureté de l'ADN, l'efficacité de l'hydrolyse de l'ADN, la déphosphorylation des nucléotides normaux pour la sélection des adduits, et le marquage. La figure 10 présente les différents tests.

5.3.3.1. Pureté de l'ADN

Un aliquote de la solution d'ADN est analysé au spectrophotomètre. Le rapport 260/280 nm est déterminé et doit être compris entre 1,8 et 2, cependant ce rapport peut-être correct malgré la présence de contaminations en ARN et protéines. La pureté de l'ADN est donc contrôlée par la réalisation d'un spectre UV complet entre 220 et 320 nm. Le maximum d'absorption devant être aux alentours de 258-259 nm pour un ADN non contaminé en ARN. Un déplacement du maximum vers 250 nm indique une contamination par de l'ARN. Un épaulement du spectre à 280 nm est signe d'une contamination en protéines.

5.3.3.2. Pureté et hydrolyse de l'ADN

Un aliquote du mélange réactionnel est prélevé après hydrolyse et marqué au ^{32}P . Cela permet de vérifier l'absence d'ARN et de protéines, mais aussi de quantifier les nucléotides normaux et de contrôler l'efficacité de l'hydrolyse. Un smear au niveau de l'origine est le signe d'une contamination en protéines. Un dédoublement des quatre spots de nucléotides indique la présence d'ARN. L'intensité, plus marquée, des tâches correspondant au A et au C que celles des tâches correspondant au T et au G témoigne d'une hydrolyse incomplète, d'un faible marquage ou d'un déficit d'ATP. Il est indispensable qu'il y ait un excès d'ATP.

5.3.3.3. Enrichissement à la nucléase P1

L'efficacité de la phase "d'enrichissement" à la nucléase P1 est contrôlée par l'analyse du volume d'échantillon résiduel après dépôt en D1. La faible efficacité de "l'enrichissement" sera démontrée par la présence de nucléotides normaux. L'absence de tâche d'ATP résiduel indique une contamination en ARN et/ou en protéines.

5.3.3.4. Marquage par la T4 polynucléotide kinase

L'efficacité de marquage par la T4 polynucléotide kinase est contrôlée par le marquage d'une solution standard d'adduits de B(a)P, de concentration connue, provenant du projet européen EU5V0448 organisé par le Dr Castegnaro et ayant eu pour but de standardiser les protocoles de détection des adduits à l'ADN (Phillips et Castegnaro, 1999). Le marquage d'un ADN de sperme de saumon pur et dépourvu d'adduits est un contrôle négatif qui permet de vérifier l'absence de contaminants dans la solution d'ATP.

5.3.3.5. Contrôle des dépôts en D1

Les échantillons marqués sont déposés sur plaque de D1. Après migration les plaques sont autoradiographiées. L'observation de ces profils permet d'obtenir des informations quant à la réalisation de dépôts corrects, l'absence de protéines ou de contaminations, le marquage suffisant, mais aussi pour vérifier la non migration de nos adduits lors de cette étape de purification.

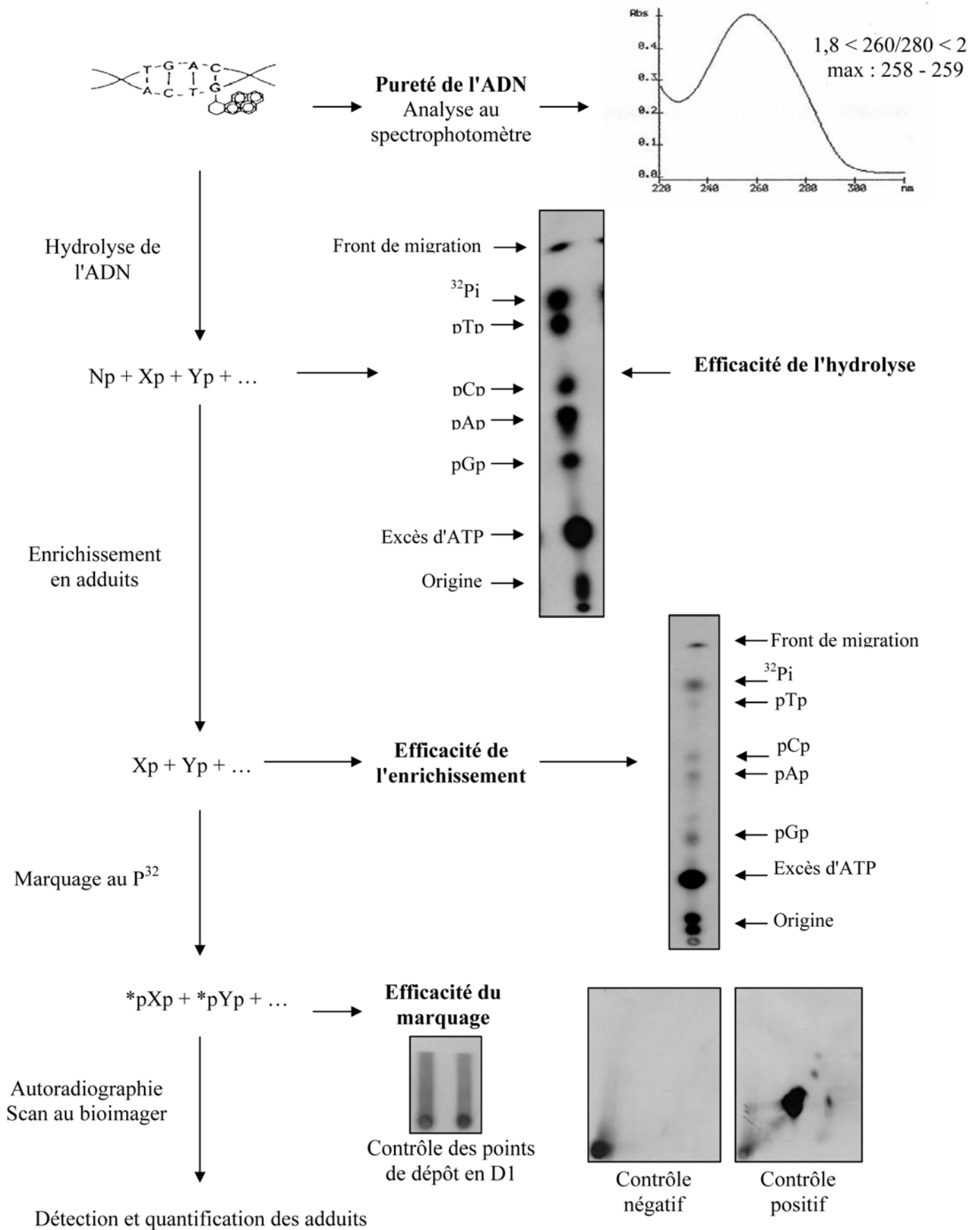


Figure 10 : Schéma des différents points de contrôle réalisés lors du déroulement du post-marquage (Faucet-Marquis ; 2005)

5. 3. 4. Extraction et purification de l'ADN

Cette première étape consiste à casser les membranes du tissu afin de libérer l'ADN des noyaux. L'extraction se fait au froid dans de la glace pour limiter l'activité des DNases cellulaires et ainsi préserver l'intégrité de l'ADN.

L'ADN a été extrait et purifié selon la méthode décrite par Pfohl-Leszkowicz *et al* (1991) avec une modification mineure décrite ci-après. Les culots cellulaires ont été homogénéisés dans 0.7 mL d'une solution contenant NaCl (0.1M), EDTA (20 mM), et Tris-HCl, pH 8 (50 mM) (SET), et agités au vortex pendant 6 min en présence de 0.4 g de billes de verre (0.5 µm). Cette modification a été introduite car les parois levuriennes sont plus difficiles à rompre que les cellules animales. Ensuite, cent µl de SDS à 20 % sont ajoutés à l'échantillon et incubés pendant 10 min à 65 °C pour casser les membranes. Puis, les protéines sont précipitées par ajout de 800 µl d'Acétate de potassium (6 M, pH 5) pendant 30 min dans la glace. L'échantillon est ensuite centrifugé à 0 °C, 25 min à 14000 g (Sigma 1K-15, SELI, Toulouse, France). Les acides nucléiques, dissous dans le surnageant, sont précipités par ajout d'éthanol pur et froid (2 volumes). La précipitation dure toute une nuit à -20 °C.

Le lendemain, les acides nucléiques sont récupérés après centrifugation à 14000 g, 15 min à 0 °C. Puis, le culot est lavé avec de l'éthanol à 90 % pendant 15 min à 0 °C à 14000 g avant d'être solubilisé dans 500 µL de SET. Chaque échantillon est traité pendant 2 heures à 37 °C avec 20 µl d'un mélange (v/v) de ribonucléases pancréatique A (RNAse A, 20 mg/ml) et T1 (RNAse T1, 10 000 UI/ml) préalablement bouilli à 100 °C pendant 15 min. Vingt cinq µl de protéinase K (PK, 20 mg/ml dans du SET) sont ajoutés au mélange réactionnel et incubés pendant 1 h à 37 °C ; ce qui permet l'élimination des protéines. Pour terminer la purification, une extraction par du Rotiphénol (phénol saturé en Tris), est réalisée sur la fraction aqueuse de chaque échantillon. Le phénol dénature les protéines. Pour chaque échantillon, on ajoute du phénol, volume à volume, sur la phase aqueuse contenant l'ADN. Le contact des deux phases est assuré par une agitation de 20 min sur table agitante à température ambiante. Puis, la phase aqueuse est séparée de la phase organique par centrifugation (15 min, 15 °C, 14000 g). Les protéines dénaturées se retrouvent à l'interphase et il faut alors éviter de les prélever. Pour éliminer les traces de phénol qui inhibe les enzymes d'hydrolyse, une extraction est réalisée avec un mélange de chloroforme et d'alcool isoamylique (24 /1), volume à volume, sous agitation (20 sec). Une centrifugation de 5 minutes permet de récupérer la phase aqueuse dépourvue de toute trace de phénol. L'ADN est précipité par ajout d'éthanol froid pur (2 volumes) et 50µl d'acétate de sodium (5 M), à -20 °C pendant deux heures à une nuit. Une centrifugation de 30 minutes à 0 °C permet d'obtenir un culot d'ADN qui est ensuite lavé trois fois à l'éthanol 80 % (15 min, 0 °C) pour éliminer les sels. Après évaporation des gouttes résiduelles d'éthanol, l'ADN purifié est dissous dans 400 µl d'eau ultra pure toute une nuit.

5. 3. 5. Estimation de la qualité et de la quantité d'ADN

Les solutions d'ADN sont mises 15 minutes au bain-marie à 37 °C avant lecture au spectrophotomètre (Secomam, Anthelie advanced 5). L'intégralité de l'échantillon est transférée dans des cuves en quartz de 1 ml de contenance. La pureté et la quantité d'ADN en solution sont évaluées en faisant un spectre entre 220 et 320 nm. Le maximum d'absorption de la molécule d'ADN se situe entre 258 et 260 nm. Au delà de cet intervalle, un déplacement du maxima d'absorption vers 250 nm ou 280 nm indique une contamination de l'ADN par de l'ARN (et /ou des traces de phénol), ou par des protéines respectivement. Par conséquent sa purification doit être refaite à partir de cette solution.

On calcule la quantité d'ADN de l'échantillon en considérant que 1 unité d'absorbance équivaut à 50 µg/ml. Des aliquotes contenant 7 µg d'ADN sont préparés à partir de la solution mère

d'ADN et sont ensuite séchés à l'aide d'une centrifugeuse à évaporation sous vide (« Speedvac concentrator » de Savant). A partir de cette étape, l'aliquote d'ADN est prêt à être marqué.

5.3.6. Marquage des adduits

Les différentes étapes du marquage au ^{32}P sont schématisées dans la figure 9.

5.3.6.1. Hydrolyse de l'ADN

Sept μg d'ADN sont séchés puis hydrolysés en nucléosides-3'-monophosphates par les actions combinées de la phosphodiesterase de rate et de la nucléase de staphylocoque pendant 4 heures à 37 °C dans 10 μl du mélange réactionnel suivant :

- 0,47 μl de phosphodiesterase de rate (2 mg/ml)
- 1 μl de nucléase de Staphylocoque (3,2 mU/ μg d'ADN)
- 2 μl de tampon succinate (200 mM)/ CaCl_2 (100 mM), pH 6 (avec HCl pur)
- 6,53 μl H_2O ultra pure

5.3.6.2. "Enrichissement" à la nucléase P1

L'ADN hydrolysé est incubé 45 min à 37 °C après avoir rajouté 5 μl du milieu réactionnel :

- 1,5 μl de nucléase P1 (4 mg/ml)
- 1,6 μl de ZnCl_2 (1 mM)
- 1,6 μl Acétate de Na (0,5 M, pH 5)
- 0,3 μl H_2O ultra pure

La réaction est stoppée par l'ajout de 3 μl de Tris base (500 mM).

5.3.6.3. Marquage des adduits au ^{32}P en position 5'

Après "enrichissement" à la nucléase P1, les échantillons sont incubés 45 min en « salle chaude » (salle radioactive) à 37 °C en ajoutant 5 μl du mélange réactionnel suivant :

- 2 μl de tampon bicine *
- 0,32 μl de polynucléotides kinase T4 (10 UI/ μl)
- 100 μCi d' ^{32}P -ATP préalablement séché
- 2,68 μl d' H_2O ultra pure

* le tampon bicine est constitué de la façon suivante : 500 μl de bicine 800 μM , 500 μl de dithiothréitol (DTT) 400 mM, 500 μl de MgCl_2 400 mM, 55 μl de spermidine 400 mM, 445 μl d'eau distillée ajusté à pH 9,8 avec de la soude.

5.3.6.4. Test d'efficacité de l'hydrolyse : marquage des nucléotides normaux

2 μl de la solution d'ADN hydrolysée sont prélevés et dilués (x 1200) dans de l'eau ultrapure. Un volume de 5 μl de cette solution est prélevé et incubé en salle chaude 1h à 37°C en présence de 8 μl d'eau ultra pure et de 5 μl du mélange réactionnel suivant :

- 2 μl de tampon bicine *
- 0,32 μl de polynucléotides kinase T4 (10 UI/ μl)
- 100 μCi d' ^{32}P -ATP préalablement séché
- 2,68 μl d' H_2O ultra pure

Après une heure d'incubation, le volume réactionnel est complété jusqu'à 300 µl par de l'eau ultra pure soit 282 µl, puis 3 µl sont prélevés et déposés sur une plaque de PEI cellulose de 18 cm de long. Celle-ci est mise à migrer 1 h 30 min dans du tampon à 250 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 40 mM de NaH_2PO_4 . La plaque est ensuite séchée, exposée 40 min à température ambiante puis autoradiographiée. Les nucléotides normaux sont séparés comme indiqué sur la figure 10.

5.3.6.5. Test d'efficacité de "l'enrichissement" par la nucléase P1

Un volume de 50 µL d'eau ultrapure est ajouté dans le tube vidé du mélange d'adduits à l'ADN marqués au ^{32}P . On réalise ainsi une dilution du mélange d'adduits qui est resté présent sur les parois du tube.

Un volume de 5 µL est alors prélevé et déposé sur une plaque de PEI cellulose de 18 cm de long. Celle-ci est mise à migrer 1 h 30 min dans du tampon à 250 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 40 mM de NaH_2PO_4 . La plaque est ensuite séchée, exposée 40 min à température ambiante puis autoradiographiée.

Ce test permet de savoir si l'hydrolysate d'ADN a bien été enrichi en adduits par le traitement avec la nucléase P1 qui catalyse la déphosphorylation en 3' des nucléotides normaux. Ceux-ci ne sont plus des substrats de la polynucléotide kinase et ne doivent donc pas être marqués au ^{32}P pendant le marquage des adduits à l'ADN. Sur le film d'autoradiographie, les bases de l'ADN ne doivent être que d'une très faible intensité (figure 10).

5.3.6.6. Séparation des adduits par chromatographies bidimensionnelles sur couche mince de polyéthylène imine cellulose

Plusieurs chromatographies (figure 11) sur des plaques de PEI cellulose sont nécessaires afin de séparer les adduits selon leurs propriétés chromatographiques selon l'ordre suivant :

Dépôt des échantillons et purification des adduits (D1)

A l'extrémité de chacune des plaques de cellulose de 18 cm × 13 cm, est accroché un papier Whatman de 20 cm de longueur. Chaque plaque est prévue pour recevoir six dépôts d'échantillons. Les dépôts sont espacés entre eux de 2 cm. La migration dure 16 heures dans du phosphate monosodique (2,3 M ; pH 5,7). Ce solvant ne permet pas la migration des adduits, qui étant hydrophobes, restent au point de dépôt. Une fois la migration terminée, la bande de papier est jetée et la plaque est lavée deux fois 5 min dans de l'eau distillée sous agitation.

Une autoradiographie des plaques (20 minutes en salle obscure, révélation, rinçage à l'eau distillée, fixation et rinçage à l'eau distillée) permet de vérifier la pureté de l'échantillon.

Transfert et migration bidimensionnelle pour la séparation des adduits

Migration D2

Cette étape permet de transférer le dépôt sur une plaque de cellulose de 18 cm × 13 cm et de faire migrer les adduits dans le sens vertical de la plaque. Les points de dépôt sont découpés de la plaque de D1 et le transfert sur la plaque D2 se fait de cellulose à cellulose, le tout maintenu par des aimants. La migration est amorcée dans de l'eau distillée et les plaques sont ensuite placées dans des cuves avec 70 ml de solvant (Urée 7,7 M, formate de Li 4,8 M, pH 3,5). La migration dure environ 4 heures à 25 °C. Les plaques sont ensuite lavées deux fois à l'eau distillée pendant 5 minutes puis séchées. Les plaques sont découpées à la dimension 16 × 13 cm.

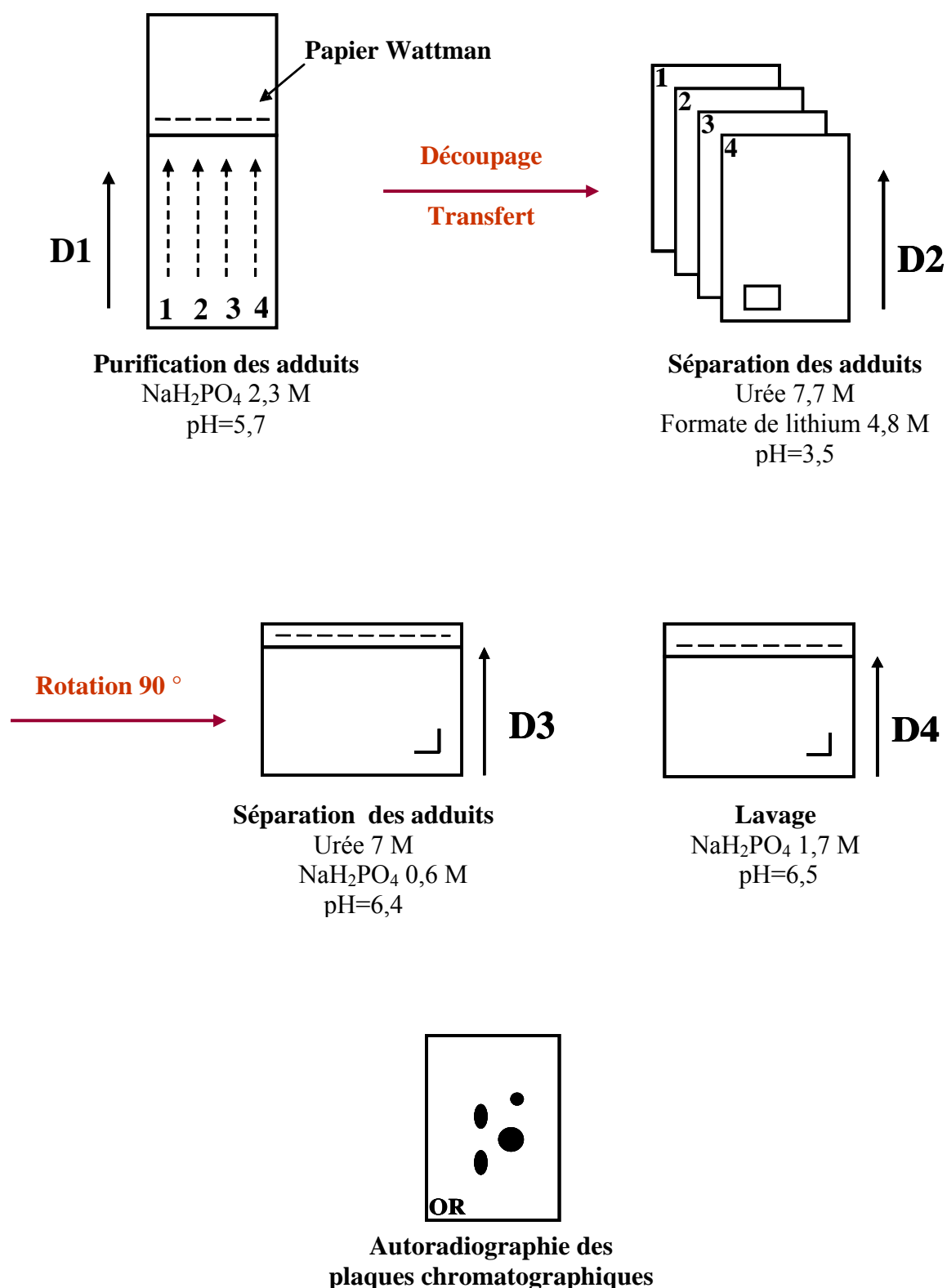


Figure 11 : Chromatographies successives pour la purification et la séparation des adduits sur les plaques de PEI cellulose (Pfohl-Leszkowicz, 1994a)

Migration D3

La migration D3 s'effectue dans le sens perpendiculaire à la migration D2 (1/4 de tour à gauche) et permet de déplacer les adduits dans le sens de la largeur de la plaque. Une bande de papier Whatman (16 cm × 2,5 cm) est agrafée dans le sens de la longueur de la plaque sur le bord de la plaque. La migration est amorcée dans un solvant D3' (NaH₂PO₄ 0,7M). Les plaques sont placées dans des cuves contenant 70 ml de solvant de migration (NaH₂PO₄ 0,6 M, Urée 7 M, pH 6,4) à 25°C. La migration dure 3 h. Après avoir éliminé le papier Whatman, les plaques sont lavées deux fois à l'eau distillée pendant 5 minutes puis séchées.

Migration D4.

La migration D4 est dans le même sens que la migration précédente. Il s'agit essentiellement d'un lavage permettant d'éliminer la radioactivité non spécifique et donc de réduire le bruit de fond. Une bande de papier Whatman (16 cm × 4 cm) est agrafée dans le sens de la longueur de la plaque. La migration dure 2 h dans 70 ml de phosphate monosodique (NaH₂PO₄ 1,7 M, pH 6) à 25°C. Après avoir enlevé le papier Whatman, les plaques sont lavées deux fois 5 minutes à l'eau distillée puis séchées et découpées au format 9,5 cm × 14,5 cm à partir de l'origine du dépôt.

5. 3. 7. Autoradiographie et quantification des adduits

Les plaques sont mises à autoradiographier avec des films ultrasensibles (20 cm/40 cm) sur lesquels on pose un écran amplificateur, le tout est placé 48 h à -80 °C. Les films sont ensuite placés dans un bain de révélateur (20 %) jusqu'à apparition des spots d'adduits (1 minute environ), puis rincés à l'eau distillée et fixés pendant 1 minute dans un bain de fixateur (20 %) puis rincés successivement dans deux bains d'eau distillée. Après séchage, les films sont ensuite scannés.

Pour la quantification des adduits, les plaques de cellulose sont scannées par un bioimager et les scans sont traités par le logiciel « Ambis ». Les valeurs obtenues par quantification au bioimager sont exprimées en coups par minute (CPM). Les taux d'adduits sont exprimés en adduits/10⁹ nucléotides en tenant compte de la quantité d'ADN, de l'activité spécifique de l'ATP, de la décroissance de l'ATP et du calibrage de l'appareil.

Calibrage du bioimager

Le nombre de molécules radioactives peut être déterminé en mesurant la quantité de leur produit de décomposition. Le radio-isotope ³²P émet, en se désintégrant, des particules β, ayant des forts niveaux d'énergie, qui peuvent être facilement mesurées. Les méthodes de mesure de ces particules ne sont pas efficaces à 100 % et la valeur obtenue ("coups par minute" ou CPM) est plus faible que le nombre réel de désintégrations ("désintégrations par minute" ou DPM). Le processus ne détecte donc qu'une partie des décompositions. Cette proportion dépend de l'efficacité du processus de détection.

Il nous est nécessaire de connaître la quantité de ³²P mesurée en termes absolus, c'est à dire le nombre exact de désintégrations par unité de temps. On peut le déduire directement à partir des CPM en sachant l'efficacité du processus de comptage.

Pour cela, nous avons réalisé une courbe de calibration de l'appareil déterminant la proportion des molécules qui sont détectées. Nous avons analysé 16 concentrations en ATP différentes allant de 0,025 à 100 nCi. Pour chaque concentration analysée cinq essais sont réalisés. 5µl de chaque concentration sont déposés sur plaque de PEI cellulose et scannées au bioimager. Sachant que 1 Ci est égal à 2,22 x 10¹² DPM, on peut estimer le nombre de DPM attendus. A partir des données en CPM obtenues et des valeurs en DPM estimées, on a déterminé une courbe étalon

dont l'équation a servi de référence, dans nos expériences, pour passer des CPM aux DPM. Nous avons observé que l'efficacité de comptage de l'appareil dépend de la concentration analysée, plus la concentration en composé radioactif est basse plus l'efficacité sera faible. Ainsi nous avons déterminé trois intervalles de concentrations pour chacun, desquels une équation de droite a été déterminée; ces résultats sont présentés sur la figure 12.

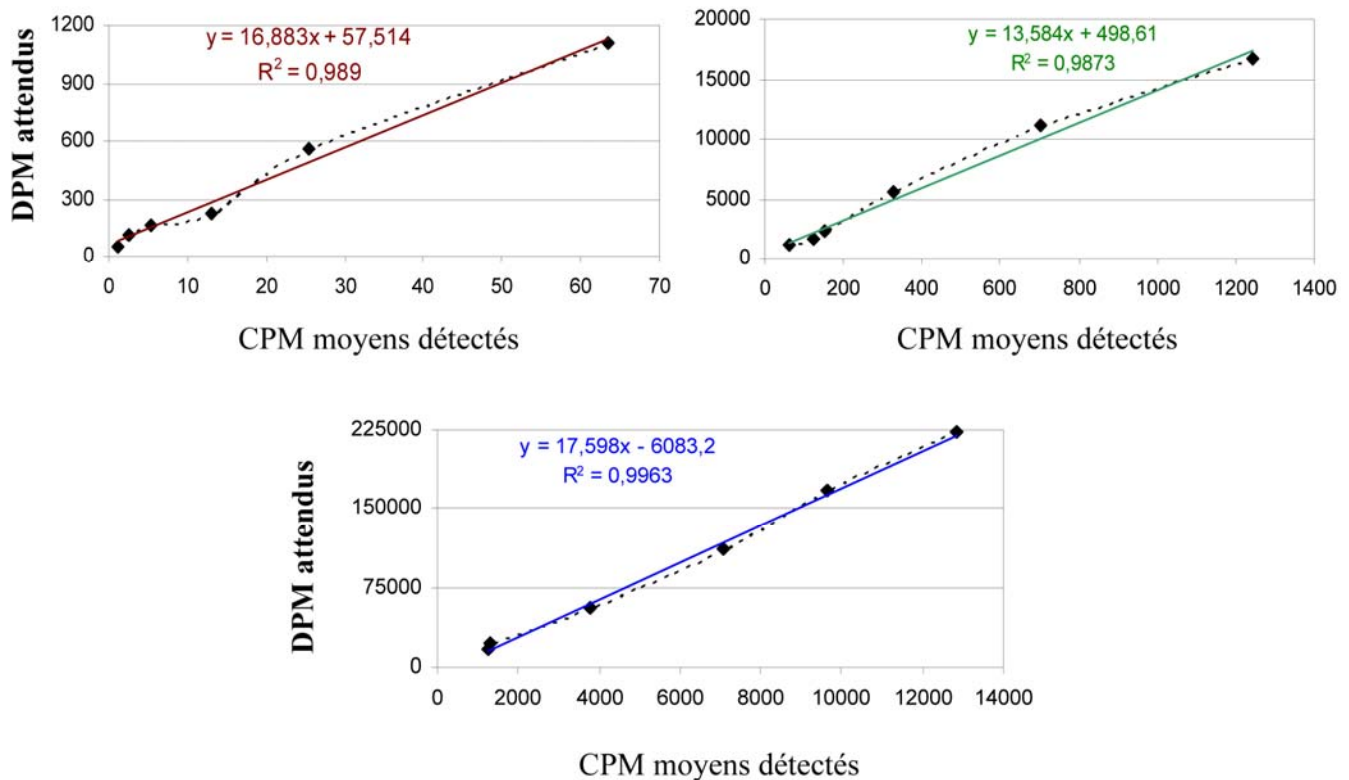


Figure 12 : Régressions linéaires des CPM moyens détectés par le bioimager en fonction des DPM estimés attendus (Faucet-Marquis ; 2005)

Des données présentées ci-dessus, nous avons déterminé les conditions suivantes pour nos calculs du nombre d'adduits:

- de 1 à 60 cpm comptés, $dpm = 16,883 \times X \text{ cpm} + 57,514$
- de 60 à 1200 cpm comptés, $dpm = 13,584 \times X \text{ cpm} + 498,61$
- de 1200 à 13000 cpm comptés, $dpm = 17,598 \times X \text{ cpm} - 6083,2$

6. Calcul des paramètres cinétiques

Cinétique de croissance

Le temps de latence, le taux de croissance (μ) et le temps de génération ont été déterminés en portant le logarithme népérien (Ln) de la concentration cellulaire en fonction du temps pour chaque échantillon. Le temps de latence a été donné par l'abscisse du point d'intersection de la droite logarithmique de croissance avec la droite horizontale passant par le point correspondant au logarithme népérien de l'inoculum. Le taux de croissance a été estimé par la pente de la droite

logarithmique de croissance en phase exponentielle et le temps de génération de la phase exponentielle a été calculé par la relation $\text{Ln}(2)/\mu$.

La quantité de biomasse maximale ΔX_{max} exprimée en (UFC.mL^{-1}) ou (cell.mL^{-1}) a été obtenue par la relation : $\Delta X_{\text{max}} = X_F - X_0$

Le facteur de bioconversion (ou rendement) du substrat en biomasse ($Y_{X/S}$), a été obtenu par le rapport : $Y_{X/S} = (X_F - X_0)/(S_0 - S_F)$

La productivité en biomasse ($\Delta x/\Delta t$) ou vitesse de croissance r_x , exprimée en ($\text{UFC.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ou ($\text{cell.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$) a été déterminée par le rapport : $r_x = (X_F - X_0)/t_F$

avec : X_0 : Concentration de la biomasse à l'inoculation ou inoculum (UFC.mL^{-1}) ou (cell.mL^{-1}).

X_F : Concentration de la biomasse au début de la phase stationnaire de croissance (UFC.mL^{-1}) ou (cell.mL^{-1}).

S_0 : Concentration du substrat au temps de l'inoculation (g.L^{-1}).

S_F : Concentration du substrat au début de la phase stationnaire de croissance (g.L^{-1}).

t_F : Temps au début de la phase stationnaire (h).

Cinétique de fermentation

Le facteur de bioconversion du substrat en produit ($Y_{P/S}$) a été obtenu par la relation : $Y_{P/S} = (P_F)/(S_0 - S_F)$

La productivité globale en éthanol ($\Delta P/\Delta t$) ou vitesse de production r_p , exprimée en ($\text{g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$) a été calculée par le rapport : $r_p = P_F/t_F$

La vitesse de consommation des sucres r_s exprimée en ($\text{g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$) a été calculée par le rapport : $r_s = (S_0 - S_F)/t_F$

avec : P_F : Concentration en éthanol en fin de fermentation (g.L^{-1}).

S_F : Concentration du substrat en fin de fermentation (g.L^{-1}).

S_0 : Concentration du substrat au temps de l'inoculation (g.L^{-1}).

t_F : Durée de la fermentation (j).

RESULTATS

CHAPITRE III

TOXICITES DES PESTICIDES

1. Etude préliminaire de toxicité

Une première recherche concernant l'action toxique des pesticides a consisté en deux parties : un premier « screening » pour déterminer l'effet des six molécules vis-à-vis des deux levures, suite auquel une seule matière active a été définitivement sélectionnée pour faire l'objet de toutes les études ultérieures ; ensuite une évaluation de la cytotoxicité de ce pesticide dans un contexte de fermentation alcoolique naturelle, par la mesure de son impact sur la croissance et la capacité fermentaire des deux levures.

Cette étude constitue donc une première vue sur les effets cytologiques des pesticides d'une part et la réponse de chacune des deux levures testées d'autre part ; celles-ci représentant non seulement des genres différents, mais aussi des types de levure différents.

Ce travail fait l'objet de la publication :

Jawich D., Hilan C., Saliba R., Lteif R., Strehaiano P., 2005. Effets de pesticides sur deux souches de levures: *Saccharomyces cerevisiae* et *Metschnikowia pulcherrima*. *Journal international de la vigne et du vin*, **39**, 2, 67-74

Cette publication présente une étude de la toxicité du chlorpyrifos-méthyle, azinphos-méthyle, benomyl, penconazole, cyhéxatin et diméthoate sur la croissance aérobie des deux levures et l'effet toxique du penconazole sur leurs cinétiques de croissance et de fermentation en cultures fermentaires.

Cette étude a permis la mise en évidence des points suivants:

- Parmi les six molécules testées, **le benomyl, le cyhéxatin et le penconazole sont toxiques** envers les 2 levures.
- **Le penconazole exerce une toxicité inégale** vis-à-vis des deux levures, cette toxicité dépend aussi des conditions de culture. En effet, *Metschnikowia pulcherrima* est moins affectée en conditions aérobies, alors que *Saccharomyces cerevisiae* se montre plus résistante en conditions fermentaires.
- En cultures fermentaires, **le penconazole exerce une forte cytotoxicité envers *M. pulcherrima***, la croissance et la capacité fermentaire de cette levure sont négativement affectées. Il y a baisse de l'assimilation du substrat, du taux de croissance, des vitesses de croissance et de production, de la biomasse formée et du degré alcoolique en fin de culture. Cependant, et dans les mêmes conditions, **le penconazole n'affecte pas les paramètres cinétiques de *S. cerevisiae***.
- **Les deux levures sont capables de prélever le penconazole** du milieu de culture avec la même efficacité, c'est une adsorption croissante au cours du temps.

L'ensemble des résultats est décrit dans l'article suivant :

**EFFETS DE PESTICIDES SUR DEUX SOUCHES
DE LEVURES : *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
ET *METSCHNIKOWIA PULCHERRIMA***

**EFFECTS OF SOME PESTICIDES ON TWO YEAST STRAINS :
SACCHAROMYCES CEREVISIAE
AND *METSCHNIKOWIA PULCHERRIMA***

JAWICH Dalal^{1,3,4}, HILAN C.¹, SALIBA R.²,
LTEIF R.³ et STREHAIANO P.^{4*}

1 : Laboratoire de Fanar, Institut de Recherche Agronomique Libanais (IRAL),
B.P. 90-1965, Beyrouth, Liban

2 : Université Libanaise, Faculté d'Agronomie, Département des Sciences et des Technologies
Agroalimentaires, B.P. 13-5368 Beyrouth, Liban

3 : Université Saint Joseph, Faculté des Sciences, Campus des Sciences et Technologies,
Mar Roukos, Mkallès, BP 11-514 Riad El Solh, Beyrouth, Liban

4. Laboratoire de Génie Chimique, UMR-CNRS 5503,
5 rue Paulin Talabot, 31106 Toulouse cedex, France

Résumé : L'effet de différentes doses (0 à 20 LMR) de six pesticides sur deux souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Metschnikowia pulcherrima* est dans un premier temps étudié sur leur croissance sur milieu gélosé. Le produit le plus actif (le penconazole) est alors étudié du point de vue de son activité en conditions fermentaires. Des différences de comportement très nettes entre les deux souches sont mises en évidence : *Saccharomyces cerevisiae*, très sensible en conditions sur milieu gélosé, est beaucoup moins affectée en conditions fermentaires alors que *Metschnikowia pulcherrima* montre en conditions fermentaires une très grande sensibilité tant du point de vue des vitesses que des rendements. Enfin, les deux souches montrent une capacité à fixer les molécules toxiques sans cependant les dégrader. Cette adsorption apparaît limitée et dès que la dose initiale dépasse 2 LMR la dose résiduelle dans le « vin » reste au-dessus du seuil admissible.

Abstract : The effect of different concentrations (0-20 LMR) of six pesticides on the aerobic growth of two yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*) was analysed. The penconazole was shown as the most efficient and its effect was then studied under fermentative conditions. *Saccharomyces cerevisiae* appeared very sensitive under aerobiosis while the fermentative cultures seemed poorly affected. On the opposite, *Metschnikowia pulcherrima* was poorly affected under aerobiosis but was severely affected under fermentative conditions. The yields as well as the reaction rates decreased when initial concentrations of penconazole were increased. At least, it was shown that both strains were able to adsorb a certain ratio of the pesticide; but the pesticide was not degraded. Also for an initial value greater than 2 LMR, the residual quantity of the pesticide was above the admitted level.

Keywords : pesticide, *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, kinetics, adsorption.

Mots clés : pesticide, *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, cinétiques fermentaires, adsorption.

INTRODUCTION

Les pesticides, principaux polluants environnementaux, peuvent laisser des résidus toxiques dans l'air, le sol et l'eau. Certains sont neurotoxiques, d'autres embryotoxiques, mutagènes, tératogènes ou carcinogènes et leur utilisation massive dans les secteurs agricole, industriel et médical constitue de ce fait une réelle menace à la fois pour l'environnement et pour la santé humaine et animale (POGACNIK et FRANKO, 1999). De nombreux fongicides organiques et systémiques sont utilisés pour combattre les champignons phytopathogènes en pulvérisation avant la récolte ou en bain avant l'entreposage des fruits et la présence de résidus sur les fruits peut avoir une incidence dommageable sur la technologie (problèmes fermentaires) ou la santé du consommateur MEZIERES *et al.*, 1988 ; BIZEAU et THOUVENOT, 1990).

Des travaux antérieurs ont étudié l'influence de certains produits phytopharmaceutiques sur la microflore naturelle des moûts, sur les cinétiques fermentaires et sur la composition et la qualité du vin (MONTEIL *et al.*, 1986 ; PILONE, 1986 ; MEZIERES *et al.*, 1988 ; DUBERNET *et al.*, 1990 ; CUINIER, 1996 ; CABRAS *et al.*, 1999), ainsi que l'aptitude des levures à accumuler ou à dégrader certaines molécules toxiques (LAL et LAL, 1987 ; VIVIANI-NAUER *et al.*, 1997 ; NISHIMURA *et al.*, 2002).

Le présent travail évalue la toxicité de six pesticides utilisés pour les traitements phytosanitaires — azinphos-méthyle, bénomyl (encore autorisé au Liban pour le traitement des fruits mais peu utilisé), cyhéxatin, chlorpyrifos-méthyle, diméthoate (autorisé au Liban et très utilisé sur les pommes) et penconazole — vis-à-vis de deux souches de levures *Metschnikowia pulcherrima* et *Saccharomyces cerevisiae*. Ensuite, la molécule la plus toxique envers *S. cerevisiae* est retenue en vue d'étudier son incidence sur la cinétique fermentaire des deux levures et leur capacité éventuelle à l'accumuler ou la dégrader. *M. pulcherrima* est une levure impliquée dans la fabrication du cidre dès le départ des fermentations et est également une des composantes de la microflore indigène des moûts (DUEÑAS *et al.*, 1994 ; PANON, 1997). *S. cerevisiae* est largement utilisée en vinification ou en fermentation alcoolique industrielle (production d'alcool à partir des mélasses sucrières ou des hydrolysats d'amidon) en raison de sa tolérance à l'éthanol, aux concentrations élevées en sucre et son pouvoir fermentaire élevé (JACKSON, 1994). Par ailleurs, cette levure est souvent utilisée comme organisme modèle par exemple dans les études biochimiques et génétiques accompagnant la détermination du mode d'action des fongicides inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol dans les mycètes (HARGREAVES *et al.*, 1996).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - MATÉRIEL CHIMIQUE

Les pesticides testés présentent vis-à-vis de leur nature chimique, de leur activité et de la LMR fixée les caractéristiques suivantes :

- azinphos-méthyle : organophosphoré, insecticide, LMR de 2 ppm ;
- bénomyl : carbamate, fongicide, LMR de 2 ppm ;
- chlorpyrifos-méthyle : organophosphoré, insecticide, LMR de 0,5 ppm ;
- cyhéxatin : organostannique, acaricide, LMR de 2 ppm ;
- diméthoate : organophosphoré, insecticide, LMR de 1 ppm ;
- penconazole : triazole, fongicide, LMR de 0,2 ppm.

Les produits utilisés (standards analytiques dont la pureté est supérieure à 99 %) sont fournis par Riedel de Haën (Allemagne). Les solutions mères (1 000 mg.L⁻¹) sont préparées dans l'éthanol et celles utilisées pour l'analyse chimique dans l'hexane. Tous les solvants utilisés sont de pureté chromatographique (Fluka, HPLC grade).

II - MATÉRIEL BIOLOGIQUE

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* et celle de *Metschnikowia pulcherrima* ont été fournies par la « Mycothèque de l'Université de Louvain » (Belgique), où elles sont respectivement répertoriées sous les numéros MUCL 31497 et MUCL 29874.

III - TEST DE TOXICITÉ SUR GÉLOSE

10 mL de gélose YPDA (10 g.L⁻¹ de glucose [Himedia], 10 g.L⁻¹ d'extrait de levure [Himedia], 10 g.L⁻¹ de bactopeptone [Oxoid] et 20 g.L⁻¹ d'Agar [Himedia]) ont été répartis dans les boîtes de Petri. Chacune d'elles a ensuite reçu un apport de la solution de pesticide de manière à obtenir les concentrations 20 LMR (LMR : dose Limite Maximale Résiduelle), 10 LMR et 5 LMR pour chaque matière active. Un témoin est réalisé avec le milieu stérile exempt de pesticides : il sert à suivre le développement normal des levures. Un triplicat est réalisé pour chaque concentration testée et pour le témoin.

Les cultures « mère » des deux levures ont été préparées dans un milieu synthétique YPD (25 g.L⁻¹ de glucose [Himedia], 10 g.L⁻¹ d'extrait de levure [Himedia] et 10 g.L⁻¹ de bactopeptone [Oxoid]), agitées à 150 rotations / minute pendant 24 heures à 28 °C, ensuite ajustées avec de l'eau physiologique (0,85 % p/v) à 10³ cellules. mL⁻¹. Un volume de 100 µL est alors prélevé et étalé sur chaque boîte de Petri. Ce test a été répété une deuxième

Effets de pesticides sur deux souches de levures

fois d'une manière indépendante (avec deux nouvelles cultures).

Le pourcentage d'inhibition a été obtenu par la relation $100 \cdot (N_t - N_p) / N_t$ où N_t représente le nombre des colonies du témoin, N_p celui de la boîte contaminée par le pesticide « p » à la concentration « c ». Les concentrations inhibitrices de la croissance de 50 % des colonies (IC50) ont été estimées à l'aide du logiciel « Curve Expert » en portant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration du pesticide.

IV - CONDUITE ET SUIVI DES FERMENTATIONS

Les expériences ont été réalisées à 25 °C dans des ballons jaugés de contenance 1 L, de volume utile 800 mL. Le milieu de culture est un moût de pomme Starking issu de culture biologique (123 g.L⁻¹ de fructose, 59 g.L⁻¹ de glucose et 13 g.L⁻¹ de saccharose et de pH 4,5) et pasteurisé (une heure à 70 °C). Chaque ballon reçoit un apport du pesticide sélectionné à partir du test de toxicité selon les concentrations correspondant à 10 LMR, 5 LMR, 2 LMR et 1 LMR et est ensuite inoculé par une culture préparée dans le même milieu (150 rotations / minute pendant 24 heures à 28 °C). Le taux d'inoculation est de 5.10⁶ cellules.mL⁻¹ (cellules viables). Un ballon exempt de pesticide permettant de suivre le déroulement normal de la fermentation a été gardé comme témoin. Pour chaque souche de levures, un duplicat a été réalisé pour chaque concentration et pour le témoin.

Un suivi quotidien de la fermentation a été réalisé par une mesure de la teneur en sucres totaux, du pH et une évaluation de la biomasse par dénombrement des colonies sur milieu (YPDA) en surface. La population est donc exprimée en UFC.mL⁻¹ (ou « unités formant des colonies » par mL). Des échantillons destinés aux dosages chimiques ont été prélevés après l'inoculation et tous les 4 jours au cours des fermentations ; ils ont été conservés à -20 °C et décongelés à température ambiante au moment de l'analyse. Les résultats ont été soumis à l'analyse des variances à l'aide du logiciel Statistica.

V - ANALYSE DES SUCRES

Fructose, glucose et saccharose ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Le chromatographe utilisé (LKB 2150) est muni d'une colonne LC - NH2 (Waters ; longueur 25 cm, diamètre interne 4,6 mm, phase stationnaire de 5 µm épaisseur) et d'un détecteur par réfractométrie. Le tout est relié à un intégrateur C-R6A Chromatopac (Shimadzu). La phase mobile est formée par une solution d'acétonitrile à 83 % en volume dans l'eau distillée, le débit en mode isocratique est maintenu à 1,5 mL.min⁻¹. Le volume injecté est 20 µL. La solution aqueuse standard contient 38 g.L⁻¹

de D (+)-fructose, 30 g.L⁻¹ de D (+)-glucose et 6 g.L⁻¹ de D (+)-saccharose. La droite d'étalonnage est tracée à partir de 5 dilutions successives de ce mélange. Les échantillons sont filtrés sur des filtres de cellulose (Millipore) de porosité 0,45 µm et chacun est dilué jusqu'à la concentration adéquate pour le placer dans la zone de linéarité de l'étalonnage.

VI - ANALYSE DE L'ÉTHANOL

La teneur en éthanol est mesurée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (Shimadzu GC 17A), munie d'une colonne remplie Carbowax 20M (Supelco) de 2 m de longueur et 2,1 mm de diamètre interne et d'un détecteur par ionisation de flamme ; le tout est relié à un intégrateur C-R6A Chromatopac (Shimadzu). La température de l'injecteur est 175 °C, celle du four est maintenue isotherme à 90 °C et celle du détecteur à 200 °C. Le gaz vecteur est l'azote à 20 mL.min⁻¹ de débit. Le n-propanol a été utilisé comme étalon interne. La solution mère de calibration utilisée est composée de 10 % v/v d'éthanol et 10 % v/v de n-propanol ; 5 dilutions successives ont servi à tracer la droite d'étalonnage. Les échantillons ont été centrifugés à 5 000 rpm pendant 15 minutes et ont subi la dilution nécessaire pour les placer dans la zone de linéarité de l'étalonnage.

VII - ANALYSE DES RÉSIDUS DE PESTICIDES

1) Préparation de l'échantillon et procédure d'extraction

La méthode d'extraction mise en œuvre est celle proposée par CABRAS (CABRAS *et al.*, 1999). Un échantillon de 5 mL est homogénéisé et ensuite centrifugé à 5000 rpm pendant 15 minutes pour séparer les levures du moût fermenté. Le culot obtenu par cette première centrifugation est mélangé avec 1 mL d'éthanol à 10 % (v/v) et centrifugé une deuxième fois. Le surnageant obtenu est ajouté au premier. Culot et surnageant ont subi une extraction séparée : chacun est additionné de 5 mL d'hexane et agité sur agitateur rotatif pendant 30 minutes. Ensuite, après séparation des deux phases, 1 µL de la phase organique est injecté dans le chromatographe.

2) Dosage des résidus

Ce dosage est également réalisé par chromatographie en phase gazeuse (Shimadzu GC 17A) sur colonne capillaire PTE-5 (Supelco ; longueur 30 m, diamètre interne 0,53 mm, phase stationnaire de 0,25 µm d'épaisseur) avec une détection par capture d'électrons. Le tout est relié à un ordinateur ayant un logiciel spécifique (class-GC 10). La température de l'injecteur est 280 °C, la colonne est soumise à un gradient de température allant de 140 °C à 265 °C avec une vitesse de 10 °C.min⁻¹, le détecteur est maintenu à 310 °C. Le gaz vecteur est l'azote (15 mL.

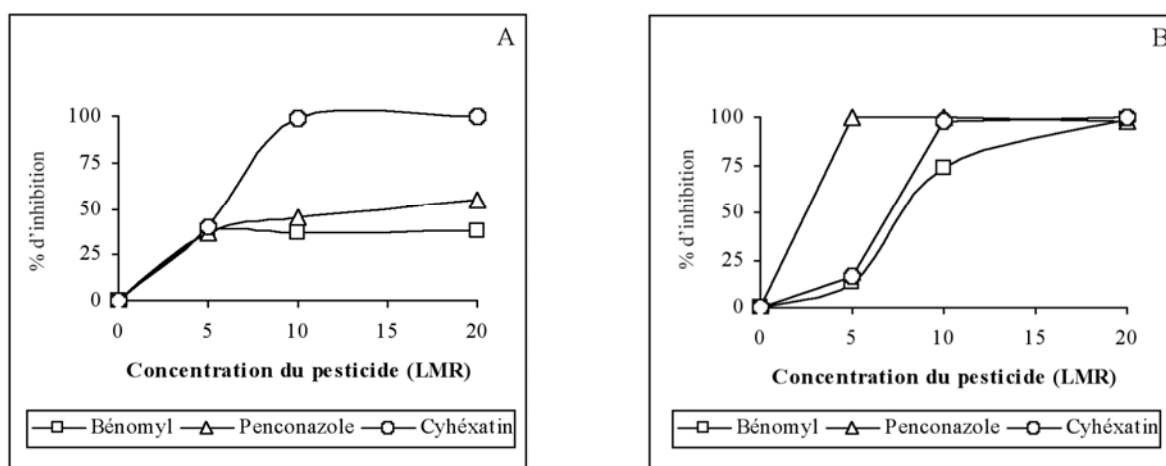


Figure 1 - Variation du pourcentage d'inhibition de la croissance en fonction des concentrations 5, 10 et 20 LMR de chaque pesticide pour *M. pulcherrima* (A) et *S. cerevisiae* (B)

Percentage of growth inhibition as a function of the initial level (5, 10, 20 LMR) of the different pesticides for *M. pulcherrima* (A) et *S. cerevisiae* (B)

min⁻¹). Le volume injecté est de 1 µL. Les solutions standards sont injectées à plusieurs concentrations pour déterminer la limite de détection, le temps de rétention, le taux de récupération et pour tracer la droite d'étalonnage correspondant à la molécule étudiée.

3) Calcul des paramètres cinétiques

« μ » étant le taux de croissance estimé par la pente de la droite logarithmique de croissance en phase exponentielle, le temps de génération « g » est obtenu par la relation : $g = \ln(2)/\mu$ soit $g = 0.693/\mu$

Le facteur de bioconversion du substrat en biomasse a été obtenu par le rapport entre la concentration de la biomasse produite (UFC.mL⁻¹) sur la concentration du substrat consommé (g.mL⁻¹), $(XF - X_0)/(S_0 - SF)$. XF et SF représentent respectivement la concentration de la biomasse et celle du substrat en fin de croissance cellulaire, X0 et S0 ces concentrations à l'inoculation.

La productivité en biomasse a été déterminée par le rapport de la concentration de la biomasse produite (UFC.mL⁻¹) sur le temps total de production (h) estimé atteint en fin de croissance cellulaire.

La productivité globale en éthanol exprimée en g.L⁻¹.j⁻¹ a été calculée par le rapport PF/tF où tF représente la durée de la fermentation.

La vitesse de consommation des sucres exprimée en g.L⁻¹.j⁻¹ a été calculée par le rapport $(S_0 - SF)/tF$ où S0 représente la concentration en substrat à l'inoculation et SF et tF la concentration en substrat et le temps en fin de fermentation.

RESULTATS ET DISCUSSION

I - TEST DE TOXICITÉ SUR GÉLOSE

Parmi les six matières actives testées, trois molécules présentent un effet hautement significatif ($p < 0,01$) par rapport au témoin. Ce sont : le bénomyl, le cyhéxatin et le penconazole. L'effet toxique qu'elles exercent sur la croissance des levures se traduit par une diminution du nombre des colonies (inhibition) et un retard de leur apparition. Aussi bien pour *S. cerevisiae* que pour *M. pulcherrima*, le retard et le pourcentage d'inhibition augmentent avec la concentration du pesticide (figure 1). Pour *M. pulcherrima* le bénomyl a présenté un maximum de 39 % d'inhibition, le cyhéxatin 95 % et le penconazole 54 %, tous atteints à 20 LMR. Par ailleurs, les colonies obtenues en présence du penconazole étaient plus petites que celles observées sur le témoin ou en présence des autres pesticides. Pour *S. cerevisiae*, les inhibitions maximales sont 99 % pour le bénomyl et 100 % pour les deux autres ; elles sont obtenues à 20 LMR sauf pour le penconazole qui a provoqué une inhibition totale (absence de colonies) à toutes les concentrations testées. Les concentrations inhibitrices à 50 % de la croissance des levures (IC50) varient selon la levure et le pesticide (tableau I).

Pour la suite du travail, nous avons retenu seulement le penconazole, car il s'est montré le plus actif vis-à-vis de la levure *S. cerevisiae* (cette levure étant considérée comme la levure de référence en matière de fermentation alcoolique).

Effets de pesticides sur deux souches de levures

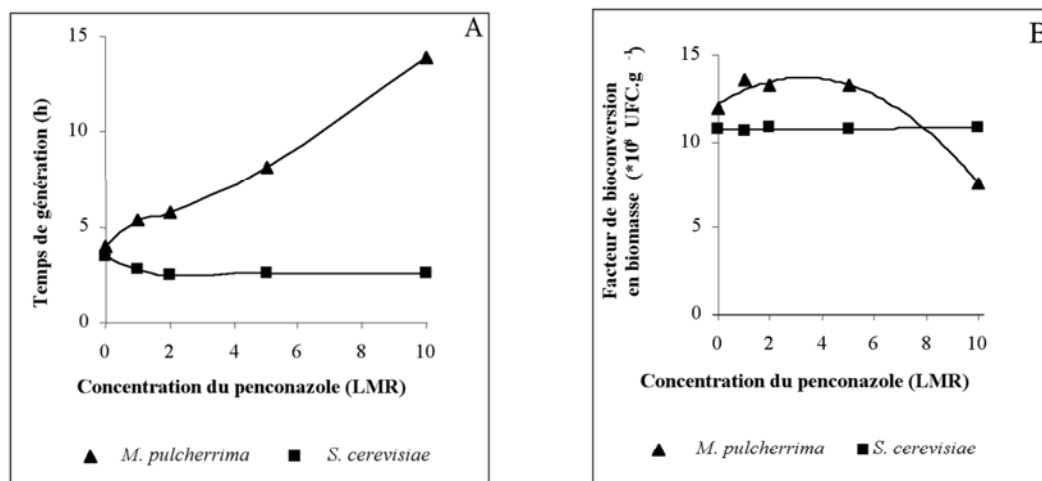


Figure 2 - Effet du penconazole sur le temps de génération (A) et sur le facteur de bioconversion du substrat en biomasse (B)

Effect of penconazole on the generation time (A) and on the substrate/biomass conversion yield (B)

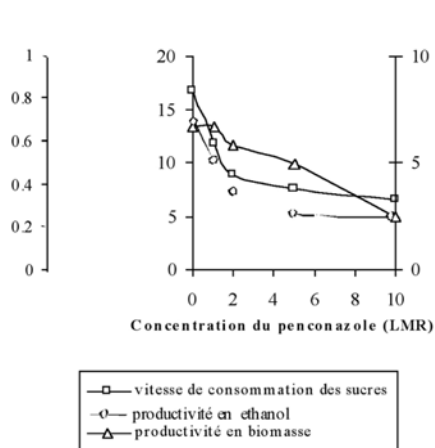


Figure 3 - Effet du penconazole sur les productivité en biomasse et en éthanol et sur la vitesse de consommation des sucres de *M. pulcherrima*

Effect of penconazole on the biomass and ethanol productivities and on the sugar consumption rate by *M. pulcherrima*

II. FERMENTATION

Si *S. cerevisiae* s'est montrée très sensible pendant le test de toxicité en croissance sur boîte de Petri (figure 1B ; tableau I) par contre, elle ne semble pas affectée par la présence du penconazole dans les conditions de fermentation. Ni le temps de génération (figure 2A), ni la consommation des sucres, ni la production d'alcool ne sont significativement affectés et les caractéristiques du « vin »

Tableau I - Concentrations inhibitrices de la croissance de 50 % des colonies (IC₅₀) pour *M. pulcherrima* (A) et *S. cerevisiae* (B)

Concentrations for inhibiting the growth of 50 % of the yeast colonies (IC₅₀) for *M. pulcherrima* (A) and *S. cerevisiae* (B)

Matières actives	IC ₅₀ (LMR)	
	<i>M. pulcherrima</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Bénomyl	ND *	8
Cyhexatin	4,5	7
Penconazole	13	1,7

* ND : non déterminé car l'inhibition maximale observée est de 39 %

en fin de fermentation sont sensiblement identiques (degrés alcooliques atteints dans une gamme allant de 9,8 % avec 9 grammes de sucres résiduels pour 0 LMR à 9,5 % avec 10 grammes de sucres résiduels pour 10 LMR). Au contraire, l'effet toxique du penconazole s'est avéré très prononcé sur la croissance et la capacité fermentaire de *M. pulcherrima*. L'inhibition de la croissance des colonies mise en évidence lors du test de toxicité (sur boîte de Petri) s'est bien traduite par un effet très négatif au niveau des paramètres cinétiques pendant la fermentation, et ceci à toutes les concentrations adoptées. Le temps de génération augmente de façon quasi linéaire avec la concentration en pesticide (figure 2A) et nous observons une diminution brutale du facteur de bioconversion du substrat en biomasse (figure 2B), à 10 LMR. Cette sensibilité de la levure *M. pulcherrima* au penconazole dans les conditions de fermentation s'exprime éga-

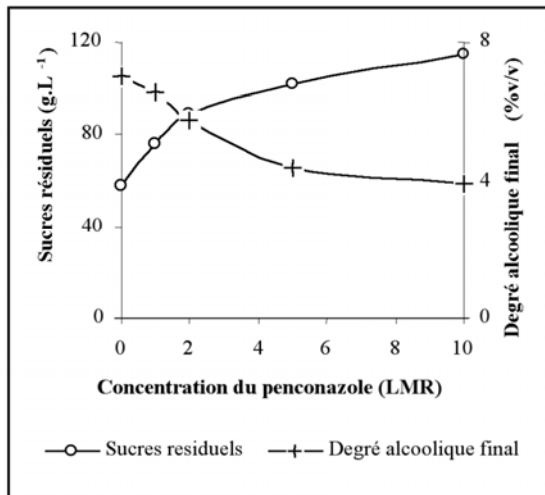


Figure 4 - Effet du penconazole sur la concentration des sucres résiduels et sur le degré alcoolique final avec *M. pulcherrima*

Effect of penconazole on residual sugar concentration and on final alcohol concentration with *M. pulcherrima*

lement au niveau des productivités (figure 3) : les vitesses moyennes de consommation des sucres, de production d'alcool et de biomasse diminuent sensiblement avec l'augmentation de la dose initiale de pesticide. Ceci se traduit par un taux élevé de sucres résiduels et un faible degré alcoolique final (figure 4).

De tels résultats contradictoires entre essais sur milieux gélosés en conditions de respiration et tests fermentaires ont souvent été cités dans le contexte interaction « levures-pesticides ». S'il a été montré que toute influence révélée

par un test de toxicité réalisé sur gélose pouvait correspondre à une gêne de l'activité des levures en fermentation (MONTEIL *et al.*, 1986), il demeure cependant que de nombreux paramètres entrent en jeu et peuvent modifier cette relation. Ainsi, le changement du milieu ou de l'une de ses caractéristiques, le passage d'une concentration sans effet du pesticide à une autre parfois proche (CUINIER, 1996 ; VIVIANI-NAUER *et al.*, 1997), le changement du substrat et le passage du métabolisme respiratoire à celui fermentaire peuvent tous mener à des résultats divergents (RIBEIRO *et al.*, 1999). Le penconazole agit en inhibant la synthèse des stérols, avec pour conséquence en œnologie un arrêt précoce de la fermentation, mais peu ou pas d'effet sur la phase de latence (CUINIER, 1996). Le mécanisme d'inhibition s'exercerait au niveau de la membrane dont les propriétés de transfert seraient amoindries suite au manque de stérols (BUCHENAUER, 1987 ; BONALY, 1991). Dans nos essais, cet effet du penconazole sur *S. cerevisiae*, dont la capacité respiratoire est réputée faible (VASSEROT, 1996), est très marqué en conditions respiratoires et faible en conditions fermentaires, alors que nous observons le contraire avec *M. pulcherrima*.

Ainsi, si les essais *in vitro* effectués en laboratoire mettent en évidence l'empoisonnement direct des levures par les résidus de pesticides présents dans le moût (DUBERNET *et al.*, 1990) on peut aussi penser que ces substances peuvent modifier l'équilibre de la flore indigène parfois en faveur de levures néfastes, fortement résistantes, à capacité fermentaire médiocre et produisant de mauvais goûts (MEZIERES, 1988 ; CUINIER, 1996).

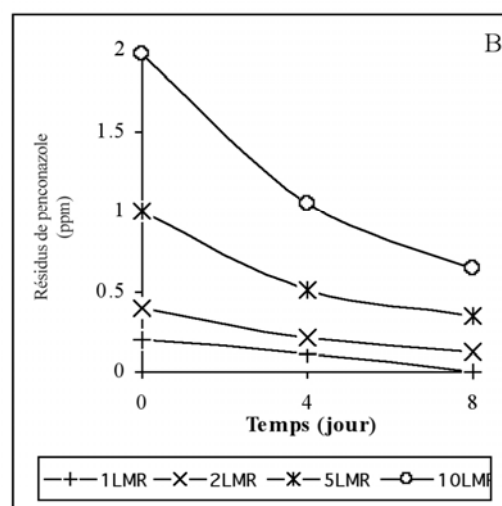
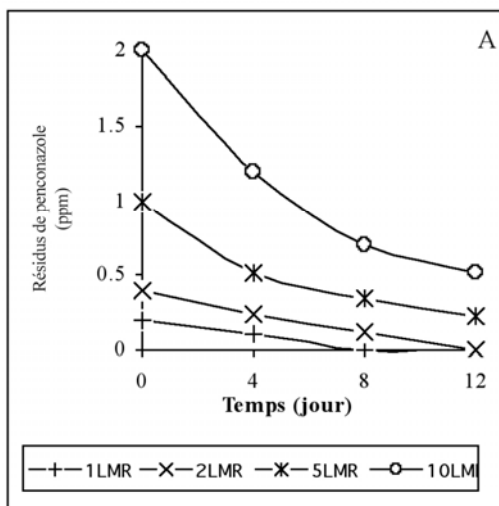


Figure 5 - Evolution des résidus de penconazole dans le moût en cours de fermentation par *M. pulcherrima* (A) et *S. cerevisiae* (B)

Behaviour of penconazole in the must during the alcoholic fermentation by *M. pulcherrima* (A) and *S. cerevisiae* (B)

Effets de pesticides sur deux souches de levures

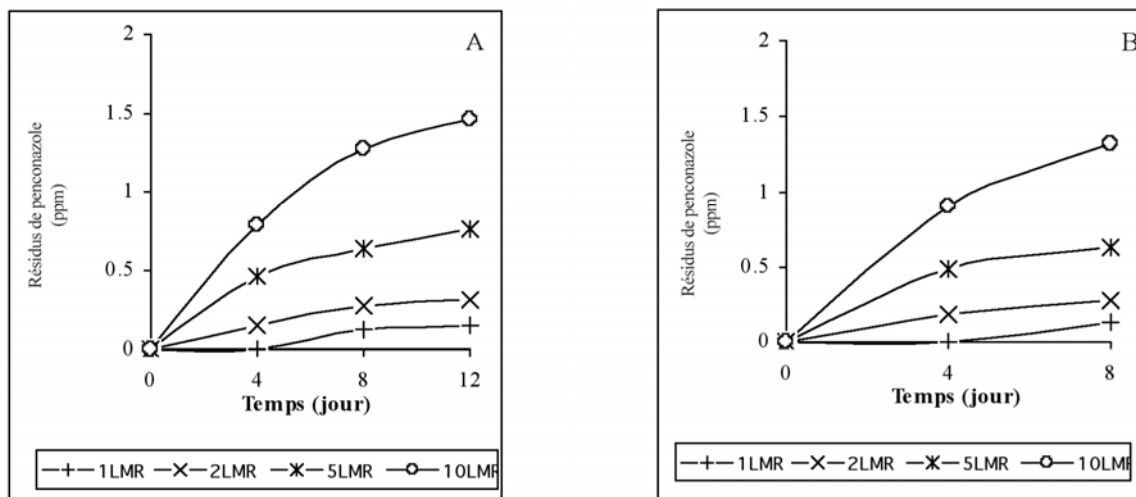


Figure 6 - Évolution des résidus de penconazole dans les levures en cours de fermentation pour *M. pulcherrima* (A) et *S. cerevisiae* (B)

Behaviour of penconazole in the yeast cells during the alcoholic fermentation by *M. pulcherrima* (A) and *S. cerevisiae* (B)

III. RÉSIDUS DE PENCONAZOLE ET BIOACCUMULATION

La troisième étape de notre travail a consisté à étudier le devenir de la molécule dans les milieux ensemencés avec ces deux souches de levure. En effet, il a été établi que, si d'un côté les pesticides peuvent affecter l'activité des levures, de l'autre, celles-ci peuvent diminuer les résidus de pesticides par adsorption et dégradation (CABRAS *et al.*, 1999). Il apparaît clairement (figure 5) que les deux levures étudiées induisent une réduction des résidus de penconazole dans le moût au cours de la fermentation. Mais on observe (figure 6) que les résidus disparus du milieu fermentaire sont retrouvés dans les levures, ce qui exclut toute possibilité de dégradation ou de métabolisation des molécules de penconazole. Celui-ci étant fortement liposoluble, il est facilement prélevé de la phase aqueuse (le moût) et fixé sur les bicouches lipidiques des membranes levuriennes (LAL et LAL, 1987; VIVIANI-NAUER *et al.*, 1997). Une fois incorporé, le pesticide est lié à des sites spécifiques localisés dans ces membranes; ainsi, à partir d'une concentration « saturante » correspondant à l'occupation de tous les sites disponibles, l'accumulation cesse et la cellule redevient passive vis-à-vis du toxique (VIVIANI-NAUER *et al.*, 1997). Dans le cas présent, le schéma de la bioaccumulation est identique pour les deux levures et pour toutes les concentrations du penconazole: c'est une adsorption croissante en fonction du temps de contact levures-pesticide (figure 6). Les teneurs accumulées étant assez élevées (~65 % de la quantité initiale), les deux levures étudiées semblent efficaces en matière de décontamination du milieu fermentaire des résidus de penconazole. Les échantillons contenant le double de la LMR sont devenus consommables (dose résiduelle inférieure à la LMR), mais pour ceux conte-

nant 5 et 10 LMR une dépollution de 65 % ne ramène pas les résidus à une teneur acceptable.

CONCLUSION

Cette étude a permis la mise en évidence de l'incidence préjudiciable des pesticides sur les croissances en conditions aérobies et sur les cinétiques fermentaires de deux souches de levures (de genre et espèces différents) usuellement rencontrées dans les milieux en fermentation (vin, cidre). Une première évaluation de la toxicité des pesticides envers *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* est déterminée par un test effectué sur gélose. Des six pesticides testés, l'azinphos-méthyle (insecticide), le chlorpyrifos-méthyle (insecticide) et le diméthoate (insecticide) n'ont pas montré d'effet significatif sur la croissance des deux souches de levures testées. Au contraire, la croissance des deux levures est significativement diminuée en présence de cyhexasin (acaricide), de penconazole (fongicide) et de benomyl (fongicide). En ce qui concerne l'effet du penconazole sur l'activité fermentaire nous observons que la levure *M. pulcherrima* est profondément perturbée par l'action de cette matière active (son activité fermentaire et sa croissance sont fortement diminuées) alors que *S. cerevisiae* apparaît plus résistante, les fermentations se déroulant normalement dans les limites des doses de penconazole étudiées (10 fois la LMR).

Par ailleurs, nous montrons que la disparition du penconazole du milieu fermentaire s'explique par un piégeage de la molécule par les cellules de levure, sans que l'on puisse dire s'il s'agit d'une adsorption de surface ou d'une fixation sur des sites intracellulaires. De ce point de vue les deux souches présentent un comportement identique.

JAWICH Dalal *et al.*

Néanmoins cette « fixation » n'est pas totale et, dans nos essais, dès que la dose initiale dépasse 2 LMR la dose résiduelle dans le « vin » est encore supérieure à la dose admissible.

Dans la poursuite de cette étude nous nous intéresserons à certains aspects de l'action de ces molécules : rémanence de l'effet sur les cellules « filles », stades physiologiques de plus grande sensibilité, effets irréversibles sur l'ADN cellulaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BIZEAU C. et THOUVENOT D., 1990. Mise en évidence de divers facteurs pouvant influencer la vitesse de fermentation du jus de pommes. *Cahier scientifique et technique*, 330-335.
- BONALY R., 1991. Ultrastructure des levures, 97-110. In : *Biotechnologie des levures*. ed. Masson, Paris, 426 p.
- BUCHENAUER H., 1987. Mechanism of action of triazolyl fungicides and related compounds, 205-232. In *Modern selective fungicides*. ed. Longman scientific and technical, New York, 383 p.
- CABRAS P., ANGIONI A., GARAU V.L., PIRISI F.M., FARRIS G.A., MADAU G. and EMONTI G., 1999. Pesticides in fermentative processes of wine. *J. agriculture food chemistry*, **47**, 3854-3857.
- CUINIER C., 1996. Influence éventuelle des produits phytomédicamenteux sur les fermentations et la qualité des vins. *Rev. fr. œnol.*, **159**, 41-43.
- DUBERNET M., FORTUNE G. et SIMON F., 1990. Enquête : produits de traitement de la vigne et accidents de fermentation. *Rev. fr. œnol.*, **123**, 35-43.
- DUNAS M., IRASTORZA A., FERNANDEZ K., BILBAO A., and HUERTA A., 1994. Microbial populations and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods. *J. food sci.*, **59**, 1060-1064.
- HARGREAVES J.A., KEON J.P.R. and CROXEN R., 1996. Molecular genetics of ergosterol biosynthesis in *Ustilago maydis*, 117-125. In *Modern fungicides and antifungal compounds*. ed. Intercept, U.K., 578 p.
- JACKSON R.S., 1994. *Wine science, principles and applications*. Ed. Academic press, San Diego, California.
- LAL S. and LAL R., 1987. Bioaccumulation, metabolism and effects of DDT, fenitrothion and chlorpyrifos on *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, **16**, 753-757.
- MEZIERES G., REY et CARBONNEL M., 1988. Les résidus des produits de traitements dans la vendange et leur influence sur la vinification. *Rev. fr. œnol.*, **114**, 19-22.
- MICHEL A., BIZEAU C. et DRILLEAU J.F., 1990. Relations métaboliques entre levures impliquées dans la fermentation du cidre. *Belgian j. food chem. biotec.*, **45**, 98-104.
- MONTEIL H., BLAZY-MAUGEM F. et MICHEL G., 1986. Influence des pesticides sur la croissance des levures des raisins et des vins. *Sci. alim.*, **30**, 349-360.
- NISHIMURA K., YAMAMOTO M., NAKAGONI T., TAKIGUCHI Y., NAGANUMA T. and USUKA Y., 2001. Biodegradation of triazine herbicides on polyvinylalcohol gel plates by the soil yeast *Lipomyces starkeyi*. *Applied microbiology and biotechnology*, **58**, 848-852.
- PANON G., 1997. Cultures mixtes et séquentielles de levures cidricoles : *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvorum*, *Hanseniaspora valbyensis* et *Metschnikowia pulcherrima*. Rôle de l'oxygène et suivi des paramètres de fermentation en milieu modèle. *Sci. alim.*, **17**, 193-217.
- PILONE G.J., 1986. Effect of triadimenol fungicide on yeast fermentations. *Am. J. enol. vitic.*, **37**, 304-306.
- POGACNIK L. and FRANKO M., 1999. Determination of organophosphate and carbamate pesticides in spiked samples of tap water and fruit juices by a biosensor with photothermal detection. *Biosensors & Bioelectronics*, **14**, 569-578.
- RIBEIRO I.C., VERISSIMO I., MONIZ L., CARDOSO H., SOUSA M.J., SOARES A.M.V.M. and LEÃO C., 2000. Yeasts as a model for assessing the toxicity of the fungicides penconazole, cymoxanil and dichlofluanid. *Chemosphere*, **41**, 1637-1642.
- VIVIANI-NAUER A., HOFFMAN-BOLLER P. and GAFNER J., 1997. *In vitro* degradation of phthalimide in aqueous solutions and in yeast suspensions. *Am. J. enol. vitic.*, **48**, 63-66.
- VASSEROT Y., 1996. La fermentation alcoolique chez *Saccharomyces cerevisiae* : aspects biochimiques et physiologiques. *Rev. fr. œnol.*, **159**, 13-16.

Manuscrit reçu le 8 février 2005 ; accepté pour publication, après modifications le 31 mars 2005

2. Etude de cytotoxicité et génotoxicité

Une étude moléculaire est réalisée pour étudier la possibilité de génotoxicité du penconazole envers le modèle cellulaire utilisé. Les effets cytologiques relevés sur le comportement cellulaire lors du traitement par le toxique pourraient éventuellement être dus à une modification de l'ADN levurien par une réaction du toxique avec cet ADN, surtout que l'adduction de l'ADN par les pesticides est très connue (Dubois *et al*, 1996, 1997 ; Nelson et Ross, 1998 ; Munnia *et al*, 1999 ; Reyes *et al*, 2002), et les levures possèdent de leur côté suffisamment de potentialités pour constituer un modèle convenable qui peut répondre à une telle question (Goin et Mayer, 1995 ; Van Den Brink *et al*, 1998 ; Ballatori et Villalobos, 2002 ; Wang *et al*, 2002). En outre, la détection d'adduits à l'ADN a souvent servi pour déceler la génotoxicité de substances chimiques environnementales diverses (Shah *et al*, 1997; Kriek *et al*, 1998; Shuker, 2002 ; Martin *et al*, 2005).

L'étude toxicologique menée comprend l'exposition à une large gamme de concentrations du toxique, à différents stades physiologiques de la croissance des cellules préadaptées au milieu de culture (un milieu semi synthétique), mais pas au toxique.

Le travail est divisé en deux parties : la première partie présente la cytotoxicité du penconazole envers les deux levures et une première mise en évidence de génotoxicité. La deuxième partie est réservée à l'analyse des adduits à l'ADN obtenus chez les deux levures.

2.1. Cytotoxicité et mise en évidence d'adduits à l'ADN chez *M. pulcherrima*

Ce travail fait l'objet d'une communication orale et d'une publication reproduites ci-après :

Jawich D., Lteif R., Pfohl-Leszkowicz A. and Strehaiano P., 2005. Effet du penconazole sur deux souches de levures utilisées en vinification : étude cinétique et moléculaire. Symposium Euro-Maghrébin sur les contaminants biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire, Fès, Maroc, 7-9 Septembre 2005 (*communication orale*)

Jawich D., Lteif R., Pfohl-Leszkowicz A. and Strehaiano P., 2006. Effects of penconazole on two yeast strains: Growth kinetics and molecular studies. *Molecular Nutrition and Food Research*, **50**, 6, 552-556

Cette publication met en évidence l'adduction du penconazole à l'ADN chez *M. pulcherrima* lors d'analyses de postmarquage au ^{32}P .

L'étude consiste à exposer les cellules à plusieurs concentrations de penconazole (1-15 LMR) dès l'inoculation, et ceci pour les deux levures. Les adduits à l'ADN sont recherchés en parallèle aux études cinétiques réalisées.

Ensuite, *M. pulcherrima* étant la levure la plus sensible vis-à-vis du penconazole dans toutes les études cinétiques réalisées, elle est la première à être l'objet d'une recherche plus poussée. Une dose unique de penconazole (10 LMR) est apportée sur des cultures de 4 h, 12 h et 24 h de cette levure afin d'étudier l'influence du stade physiologique sur la réponse au toxique. Aussi une recherche des adduits à l'ADN accompagne l'étude du comportement cellulaire.

Les points importants qui peuvent être dégagés de ce travail sont les suivants :

2.1.1. Exposition des deux levures au penconazole dès l'inoculation

- **Forte cytotoxicité** envers les deux levures : effet négatif sur les cinétiques de croissance de *S. cerevisiae* et *M. pulcherrima*, cependant *M. pulcherrima* se montre plus vulnérable.
- **Absence de génotoxicité** : aucune formation d'adduits à l'ADN n'est relevée chez les deux levures pour toutes les concentrations testées

2.1.2. Exposition de *M. pulcherrima* au penconazole au cours de sa croissance

- **Absence de cytotoxicité** : absence d'effet négatif sur la croissance des cultures exposées aux différents stades physiologiques
- **Mise en évidence de génotoxicité** : Détection d'adduits à l'ADN dans les cultures exposées au toxique après 4 h de l'inoculation

L'ensemble des résultats est présenté dans l'article suivant :

Effects of penconazole on two yeast strains: Growth kinetics and molecular studies

Dalal Jawich^{1,2,3}, Roger Lteif², Annie Pfohl-Leszkwicz³ and Pierre Strehaiano³

¹Fanar Laboratory, Lebanese Agricultural Research Institute (LARI), Beirut, Lebanon

²Université Saint Joseph, Faculté des Sciences, Campus des Sciences et Technologies, Mar Roukos, Mkallès, Riad El Solh, Beirut, Lebanon

³Laboratoire de Génie Chimique, UMR-CNRS/INPT/UPS 5503, Département Bioprocédé-Système Microbien, Toulouse cedex, France

The aim of this study consisted to evaluate the impact of a pesticide (penconazole) on the growth kinetics and genotoxicity on two yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia pulcherrima*). When the penconazole was added at different phases of the growth of *M. pulcherrima*, no effect was noticed on the kinetics of yeast growth but DNA adducts were observed when penconazole was added in the exponential phase. Increasing doses (1–15 maximum residue limit) of the pesticide added at the beginning of the fermentation did not induce DNA adducts while kinetics were affected.

Keywords: Growth kinetics / *Metschnikowia pulcherrima* / Penconazole / *Saccharomyces cerevisiae* / Yeast

Received: October 20, 2005; revised: December 22, 2005; accepted: January 5, 2006

1 Introduction

Pesticides are widely used throughout the world to control pests and enhance agricultural production. Many of them are highly toxic and they are one of the main classes of chemical environmental pollutants which can contaminate the ecosystem. Their accumulation in living organisms can be the cause of serious diseases [1–4]. In spite of the efforts to solve this common problem by implementing the integrated crop management system, developing new analytical procedures to control pesticide residues, and creating very strict regulations, toxic residues still occur in food products, water, air, and soil [5–8]. Besides their impact on food hygiene, these residues have the potential to inhibit yeast fermentations, should there be residues on fruits at harvest [9–13]. A previous study [14] established clearly the interaction between six pesticides and two yeast strains frequently used in fermentation industries: *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia pulcherrima*. Among the molecules tested, Penconazole (Fig. 1) was shown to be the most toxic for both strains as it affected growth and fermentation kinetics at all concentrations tested, starting at 0.2 mg/L, its maximum residue limit (MRL) and depending on the cultural conditions (aerobiosis and anaerobiosis). Furthermore, the two

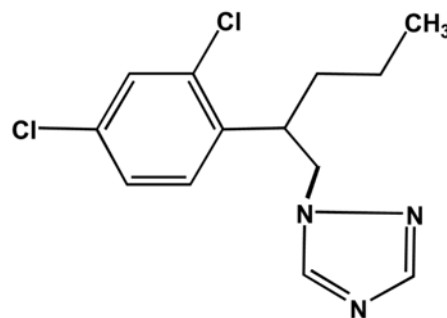


Figure 1. Chemical structure of penconazole.

yeast strains responded differently to the presence of penconazole in the culture medium, *S. cerevisiae* appeared to be more resistant as normal fermentations were observed even in presence of ten MRL of the fungicide. Penconazole is a triazolyl fungicide, it is known to exert its toxicity by inhibiting ergosterol biosynthesis causing membranes dysfunction and disability to ensure substrates intake [15, 16]. On the other hand, numerous pesticides may be metabolically activated to electrophilic compounds able to interact with DNA and to form DNA adducts [2, 17–19]; genotoxicity resulting from such covalent binding of a chemical to DNA is already well established [20, 21]. In this work we have evaluated the cytotoxicity and genotoxicity of penconazole by studying its impact on growth kinetics, and investigating its ability to induce DNA adducts, genotoxicity biomarkers, for the two yeast strains at various concentrations and different stages of yeast growth.

Correspondence: Dalal Jawich, Université Saint Joseph, Faculté des Sciences, Campus des Sciences et Technologies, Mar Roukos, Mkallès, P.O. Box, 11–514 Riad El Solh, Beirut, Lebanon

E-mail: dalal.jawich@usj.edu.lb

Fax: +961-1-682472; +961-4-532657

Abbreviation: MRL, maximum residue limit

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

The enzymes were purchased as follows: proteinase K (used as received), RNase A, RNase T1 (boiled for 10 min at 100°C to destroy DNases), and micrococcal nuclease (dialyzed against deionized water) were from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France); spleen phosphodiesterase (centrifuged before use) was from Calbiochem (VWR, France); and nuclease P1 and T4 polynucleotide kinase were from Roche diagnostics (Meylan, France). [γ - 32 P-ATP] (444 Tbq/mmol, 6000 Ci/mmol) was from Amersham (Les Ulis, France); rotiphenol (phenol saturated with Tris-HCl, pH 8) was from Rothsichel (Lauterbourg, France); cellulose MN 301 was from Macherey Nagel (Düren, Germany); polyethyleneimine (PEI) was from Corcat (Virginia Chemicals, Portsmouth, VA); Whatman no. 1 paper was from VWR; and PEI/cellulose TLC plates used for 32 P-postlabeling analyses were prepared in the laboratory. Deionized water from a Milli-Q system (Millipore) was used for preparation of all aqueous solutions. Penconazole was a Riedel De Haën product (Germany) guaranteed 99% pure. Stock solution (\approx 500 mg/L) and working solutions were prepared in pure ethanol. At first, different doses (1–15 MRL) of the fungicide were added to the fermentation media before inoculation, and in the second test, ten MRL of penconazole were added at different stages during yeast growth: exponential growth phase, decreasing growth rate phase, and stationary phase.

2.2 Yeasts

The yeast strains used were *S. cerevisiae* MUCL 31497 and *M. pulcherrima* MUCL 29874, both obtained from the Fungi collection of Catholic University of Louvain in Belgium.

2.3 Cultures

Precultures and fermentative cultures were prepared in a semidefined medium [22]. Preculture was grown in two steps to ensure 3×10^6 cells/mL in each of the culture media. A regular evaluation of yeast population was carried out during fermentation by microscopic count (yeast cells per milliliter). Samples collected for chemical and molecular analysis were stored at -20°C .

2.4 Isolation of DNA

DNA was extracted and purified as previously described [23] with a minor modification described below. Yeast pel-

lets were homogenized with 0.7 mL of a SET solution containing NaCl (0.1 M), EDTA (20 mM), and Tris-HCl pH 8 (50 mM) and were agitated by vortex for 6 min in presence of glass beads (0.5 μm). This modification was introduced because yeast walls are difficult to break in comparison with animal cells.

2.5 32 P-postlabeling analysis of DNA adducts

The method used for 32 P-postlabeling was that initially described by Reddy and Randerath [24], with minor modifications fully described in Faucet *et al.* [25].

3 Results

3.1 Kinetics

3.1.1 Addition of various concentrations of penconazole before inoculation

Different concentrations (1–15 MRL) of penconazole were added in the culture medium before inoculation. Figure 2 shows the negative effect of the pesticide on the growth kinetics of the two yeast strains. *M. pulcherrima* seems to be more sensitive than the other strain. Indeed, it was affected even by small concentrations of this toxic, whereas *S. cerevisiae*, more resistant, showed only altered growth kinetics for concentrations higher than two MRL of penconazole.

To better compare the different behavior obtained by the two yeasts, other criteria might be used, *i. e.*, final biomass produced (ΔX_{max}) and average growth rate (r_x). Figure 3 shows the evolution of these criteria in function of the toxic doses used.

3.1.2 Addition of penconazole during yeast growth

S. cerevisiae being more resistant than *M. pulcherrima* in the experiment described before (see Section 3.1.1), we tested first for the effect of penconazole added at different growth stages of *M. pulcherrima*, the sensitive yeast. The presence of the fungicide at ten MRL did not affect in any way the growth kinetics of this yeast; the same normal growth pattern was obtained in the cultures contaminated at different times after the beginning of the fermentations (4, 12, and 24 h) and in the control free of the fungicide (Fig. 4). This result may lead us to suppose that *S. cerevisiae* will not be affected, but the confirmation test should be done in the near future.

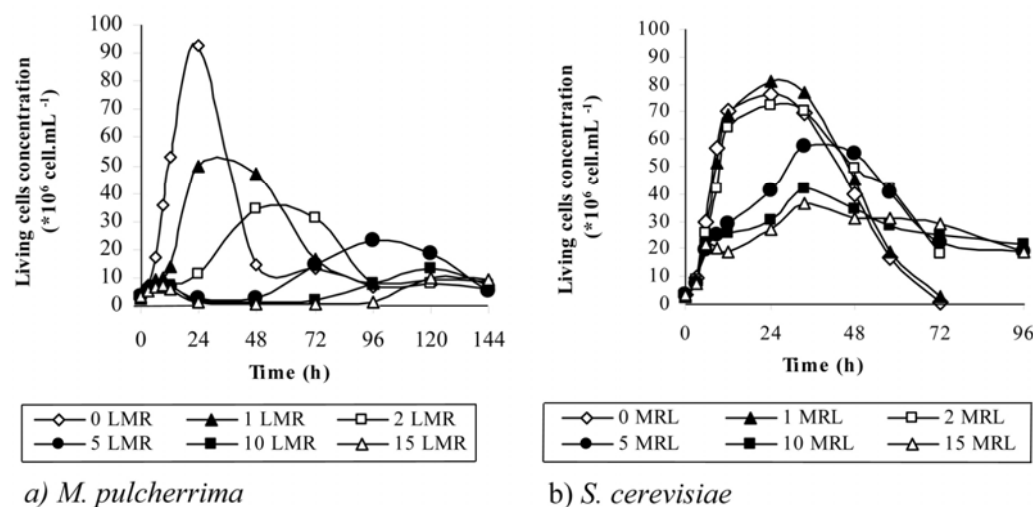


Figure 2. Effect of various doses of penconazole in addition before inoculation on growth kinetics of the two yeasts (a) *M. pulcherrima*, (b) *S. cerevisiae*.

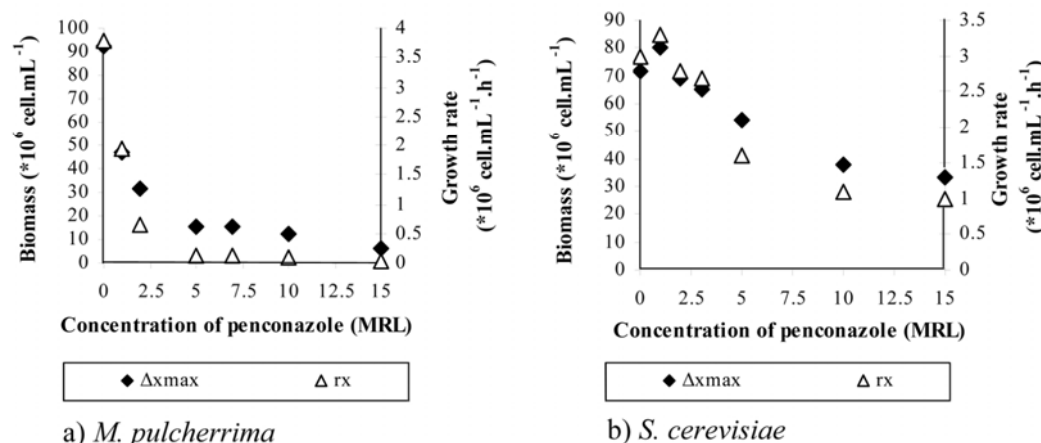


Figure 3. Effect of different doses of penconazole in addition before inoculation on the final biomass produced and the average growth rate of the two yeasts.

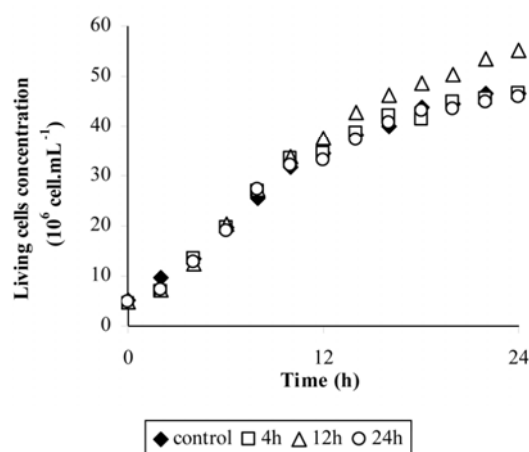


Figure 4. Effect of ten MRL of penconazole in addition during growth of *M. pulcherrima*, after 4, 12, and 24 h of the beginning of fermentation.

3.2 Molecular analysis

3.2.1 *M. pulcherrima*

DNA adducts analysis were carried out for all the culture experiments. The penconazole showed genotoxic effect only when added 4 h after the beginning of fermentation (during exponential growth phase). Figure 5 shows some autoradiograms obtained for different contact times yeast-fungicide at ten MRL. The DNA adducts were detected after 4 h of contact, they increased until 16 h and then disappeared after 24 h.

The addition of different doses of penconazole before inoculation did not induce any DNA adducts formation for any concentration (Fig. 6).

3.2.2 *S. cerevisiae*

Penconazole was not genotoxic for *S. cerevisiae* in the conditions tested, as no DNA adducts were obtained at any of

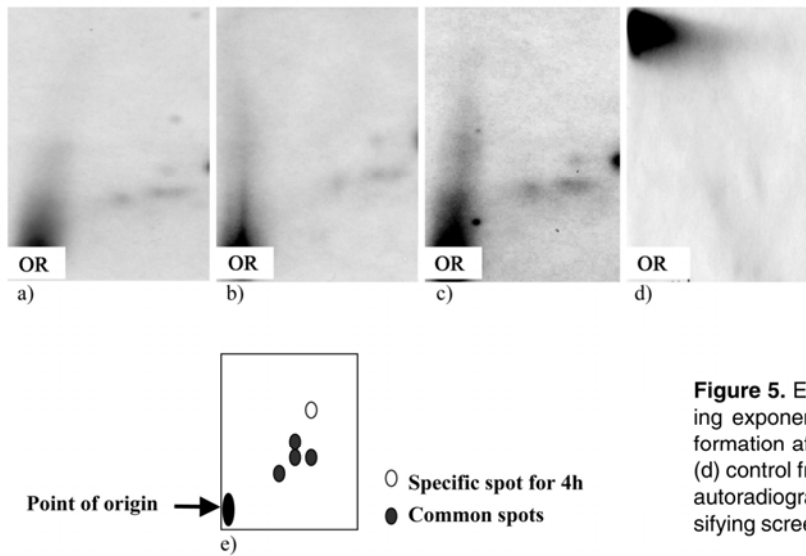


Figure 5. Effect of ten MRL of penconazole in addition during exponential phase of *M. pulcherrima* on DNA adducts formation after different contact times: (a) 4, (b) 8, (c) 12 h, (d) control free of pesticide, and (e) schematic profile. All the autoradiograms were exposed for 48 h at -80°C with intensifying screens.

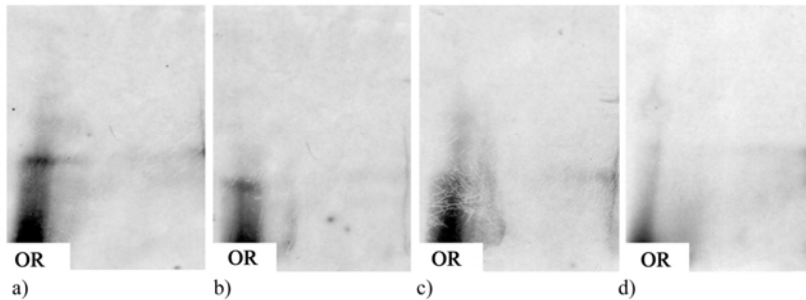


Figure 6. Effect of ten MRL of penconazole in addition before inoculation of *M. pulcherrima* on DNA adducts formation after different contact times: (a) 3, (b) 12, (c) 24 h, and (d) control free of pesticide. All the autoradiograms were exposed for 48 h at -80°C with intensifying screens.

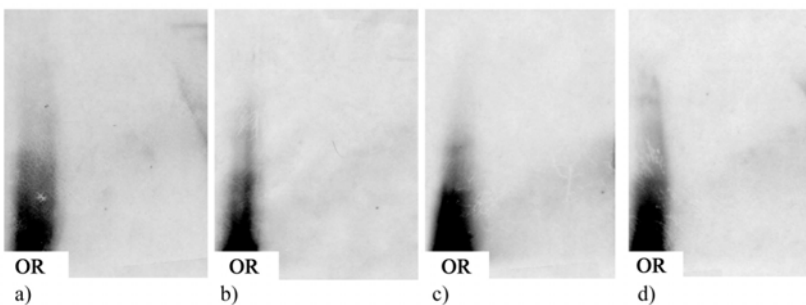


Figure 7. Effect of ten MRL of penconazole in addition before inoculation of *S. cerevisiae* on DNA adducts formation after different contact times: (a) 3, (b) 12, (c) 24 h, and (d) control free of pesticide. All the autoradiograms were exposed for 48 h at -80°C with intensifying screens.

the concentrations of the fungicide added before inoculation (Fig. 7).

4 Discussion

In this study it was shown clearly that penconazole affects the growth kinetics of *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* when present in the culture medium before inoculation. The effect was permanent all the way during the fermentations but the intensity of the response was not the same for the two yeast strains: *M. pulcherrima* exhibited high sensitivity toward the pesticide as its growth was altered even at small

concentrations (0.2 mg/L), while *S. cerevisiae* showed more resistance.

This comes as a confirmation to a previous study [14]: a larger number of concentrations of the toxic were tested in a better defined medium (a natural undefined medium was used in the precedent study). The fungicide was further investigated for its effect depending on the physiological condition of *M. pulcherrima*; therefore, a unique dose (ten MRL) was added to the growing cultures of this yeast at three different stages, and no inhibition of growth was obtained at any stage. The addition of the fungicide on active, may be less sensitive, growing populations did not

affect their growth kinetics, this might be due to the fact that, by the time the fungicide was added to the medium, the yeasts population had already grown up to 15×10^6 to 20×10^6 cell/mL, while at the initial time, cells concentration was only around 3×10^6 cell/mL, so the ratio “toxic concentration/cells number” is to be considered. Further work is in progress to clarify these issues.

On the other hand, the molecular study revealed that penconazole, in our experimental conditions, failed to produce DNA adducts in *S. cerevisiae*. In contrast, for *M. pulcherrima*, penconazole was shown to be genotoxic according to the application way of the fungicide. DNA adducts were only detected when the fungicide was added during the exponential phase, while its addition in other phases at the same dose or even in higher doses before inoculation failed to produce DNA adducts. Interestingly, the genotoxicity was revealed in opposite conditions of growth kinetics alteration. This is not surprising because mechanisms involved in cell growth are different of those leading to DNA adduct formation. In general, DNA adduct results of the covalent binding of metabolites of the toxic. As it was possible to observe DNA adduct in the exponential phase of growth, it means that yeast has metabolic capacity to bio-transform penconazole into genotoxic compounds. None is known on the metabolic pathway of penconazole in yeast and/or mammalian cells. In the future, we will compare the genotoxicity of this fungicide on mammalian cells.

5 References

- [1] Fishbein, L., in: Siegel, M., R., Sisler, H. D. (Eds.), *Antifungal Compounds*, Marcel Dekker, New York 1977, Vol. 2, pp. 537–598.
- [2] Dubois, M., Pfohl-Leszkowicz, A., De Waziers, I., Kremers, P., *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 1996, 1, 249–256.
- [3] Shah, R. G., Lagueux, J., Kapur, S., Levallois, P. *et al.*, *Mol. Cell. Biochem.* 1997, 169, 177–184.
- [4] Munia, A., Puntoni, R., Merlo, F., Parodi, S., Peluso, M., *Environ. Mol. Mutagen.* 1999, 34, 52–56.
- [5] Hedli, C. C., Snyder, R., Kinoshita, F. K., Steinberg, M., *J. Appl. Toxicol.* 1998, 18, 173–178.
- [6] Pogacnik, L., Franko, M., *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 569–578.
- [7] Nishimura, K., Yamamoto, M., Nakagami, T., Takiguchi, Y. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 58, 848–852.
- [8] Tsakiris, I. N., Toutoudaki, M., Nikitovic, D. P., Danis, T. G. *et al.*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2002, 69, 771–778.
- [9] Mezieres, R., Carbonnel, M., *Revue Française d'Œnologie* 1988, 8, 19–22.
- [10] Dubernet, M., Fortune, G., Simon, F., *Revue Française d'Œnologie* 1990, 30, 35–43.
- [11] Cuinier, C., *Revue Française d'Œnologie* 1996, 159, 41–43.
- [12] Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L., Pirisi, F. M. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 3854–3857.
- [13] Ribeiro, I. C., Verissimo, I., Moniz, L., Cardoso, H. *et al.*, *Chemosphere* 2000, 41, 1637–1642.
- [14] Jawich, D., Hilan, C., Saliba, R., Lteif, R., Strehaiano, P., *J. Int. de la vigne et du vin* 2005, 39, 67–74.
- [15] Buchenauer, H. (Ed.), *Modern Selective Fungicides*, Longman Scientific and Technical, New York 1987, pp. 205–232.
- [16] Bonaly, R. (Ed.), *Biotechnologie des levures*, Masson, Paris 1991, pp. 23–48.
- [17] Laouedj, A., Schenk, C., Pfohl-Leszkowicz, A., Keith, G. *et al.*, *Environ. Pollut.* 1995, 90, 409–414.
- [18] Dubois, M., Grosse, Y., Thomé, J. P., Kremers, P., Pfohl-Leszkowicz, A., *Biomarkers* 1997, 2, 17–24.
- [19] Nelson, G. B., Ross, J. A., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1998, 60, 387–394.
- [20] Pfohl-Leszkowicz, A., *Anal. Mag.* 1994, 22, 12–15.
- [21] Genevois, C., Pfohl-Leszkowicz, A., Boillot, K., Brandt, H., Castegnaro, M., *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 1998, 5, 283–294.
- [22] Strehaiano, P., Thèse d'état, INP Toulouse 1984.
- [23] Pfohl-Leszkowicz, A., Chakor, K., Creppy, E. E., Dirheimer, G. *et al.*, in: Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I. N., Bartsch, H. (Eds.), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tracts Tumours*, IARC Scientific Public, Lyon 1991, 115, 245–253.
- [24] Reddy, M. V., Randerath, K., *Carcinogenesis* 1986, 7, 1543–1551.
- [25] Faucet, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Dai, J., Castegnaro, M., Manderville, R., *Chem. Res. Toxicol.* 2004, 17, 1289–1296.

2.1.3. Exposition de *S. cerevisiae* au penconazole au cours de sa croissance

S. cerevisiae présente le même comportement que *M. pulcherrima* lors de l'addition de 10 LMR de penconazole au cours de sa croissance: absence de cytotoxicité à tous les stades physiologiques et mise en évidence d'une formation d'adduits à l'ADN dans les cultures exposées durant la phase exponentielle de croissance. En effet, toutes les cultures présentent des cinétiques de croissance identiques au témoin malgré l'exposition au penconazole aux différents stades physiologiques déjà cités (figure 13).

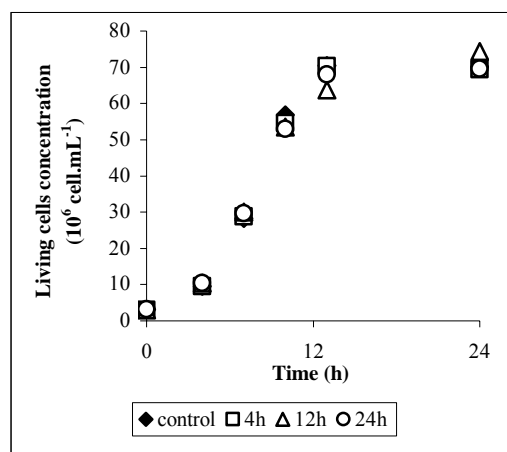


Figure 13 : Effet du penconazole (10 LMR) en addition durant la croissance de *S. cerevisiae*, après 4 h, 12 h, et 24 h de l'inoculation

2.1.4. Discussion

Aucune corrélation n'a pu être identifiée entre la cytotoxicité et la génotoxicité du penconazole, au contraire il y a un découplage complet entre le comportement cellulaire et la formation d'adduits à l'ADN chez les deux levures. Une telle réponse toxique contradictoire a été citée par Amat-Bronnert (2004) qui n'a pas trouvé une corrélation entre la cytotoxicité des thiophènes et leur génotoxicité envers les cellules hépatiques humaines.

D'ailleurs, à première vue les deux levures semblent présenter le même comportement : l'action toxique du penconazole s'exerce chez les deux dans les cas d'exposition dès l'inoculation et durant la phase exponentielle de croissance ; dans le premier cas, il s'agit d'une cytotoxicité et *M. pulcherrima* se montre plus sensible, et dans le deuxième, c'est une génotoxicité. Les cultures exposées à un stade physiologique plus avancé semblent résistantes à l'action cytotoxique ou génotoxique du penconazole.

La modification du comportement cellulaire observée dans le cas d'exposition au toxique dès l'inoculation, démontre donc d'une cytotoxicité sévère qui proviendrait de l'activité du penconazole envers la 14 α -déméthylase. L'inhibition de ce système cytochrome P450 résulterait en une déplétion de l'ergostérol membranaire entraînant des problèmes d'échange entre la cellule et le milieu et menant à la mort cellulaire (Buchenauer, 1987; Van den Bossche, 1988, 1990). D'ailleurs Ahlers *et al* (1991) ont signalé que l'accumulation des substances chimiques lipophiles dans les bicouches lipidiques des membranes pourrait parfois expliquer leur toxicité, une destruction des systèmes membranaires et des complexes enzymatiques qu'ils contiennent pouvant entraîner la mort cellulaire ; toutefois des interactions biologiques spécifiques peuvent s'y ajouter. L'effet est très négatif sur la croissance des deux levures, *M. pulcherrima* présente une forte inhibition de sa croissance dès les premières heures de culture proportionnellement à la dose appliquée, une forte

mortalité est notée, cependant qui cesse après un temps aussi proportionnel à la dose du toxique. Une poussée tardive très limitée notée plus tard chez *M. pulcherrima* serait due à une sorte d'adaptation à la présence du penconazole permettant aux cellules de se multiplier malgré sa présence (Lal et Lal, 1987 ; Cabral *et al*, 2003) ; surtout qu'une détoxification est à écarter car aucune métabolisation du toxique n'a pu être identifiée, ni par une formation d'adduits ni par une dégradation quelconque (l'étude préliminaire avait exclu toute dégradation dans ce cas, mais uniquement une simple adsorption, et l'étude moléculaire n'a pas détecté d'adduits). Toutefois, malgré cette adaptation observée, la quantité de biomasse formée demeure inférieure à la valeur normale. *S. cerevisiae* est aussi affectée par le penconazole, la baisse de la croissance entraîne une diminution de la taille de la population produite, cependant la concentration minimale inhibitrice est plus élevée, cette levure est résistante à des concentrations correspondant à la LMR et son double. Cette toxicité différentielle du penconazole envers les deux levures reflète le risque de détruire l'équilibre biologique de la microflore naturelle.

En contre partie, l'exposition au toxique durant la croissance n'entraîne aucun effet significatif sur la croissance des deux levures. Le comportement des cultures exposées en phase de croissance exponentielle, en phase de ralentissement, ou en phase stationnaire est le même, tout à fait identique aux cultures témoin. L'absence de cytotoxicité dans tous les cas indépendamment du stade physiologique considéré ne permet pas d'attribuer aucune influence au stade physiologique sur la réponse des deux levures en matière de cytotoxicité, ou aussi d'identifier un stade de plus grande sensibilité, ou l'inverse. Les cellules en phase stationnaire, en ralentissement de croissance et en phase de croissance exponentielle sont physiologiquement, biochimiquement et morphologiquement distincts (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996 ; Salmon *et al*, 1998), mais la réponse à un stress donné est régie par de nombreux facteurs parmi lesquels les propriétés du toxique, de la cellule, de la population et les conditions physicochimiques environnantes, d'où les résultats contradictoires souvent cités. Ribeiro *et al* (2000) ont obtenu des cultures de *S. cerevisiae* et de *Candida utilis* sensibles lors de l'exposition au toxique (dichlofluanide, penconazole et cymoxanil) dès l'inoculation alors qu'elles sont résistantes en cas d'exposition durant la phase de croissance exponentielle. Par contre, Cabral *et al* (2003) ont relevé un retard de croissance des cultures de *S. cerevisiae* exposées en début de leur phase de croissance exponentielle à des herbicides acides alors qu'il n'ont pas eu d'effet aux stades physiologiques plus avancés, ainsi que Rodriguez *et al* (2004) qui ont examiné la toxicité de la 9,10 phenanthrènequinone en utilisant un modèle levurien de *S. cerevisiae* à différents stade de sa croissance, et ont obtenu une toxicité différentielle avec une sensibilité maximale en début de la phase exponentielle suivie par les stades plus tardifs mettant en évidence un rôle crucial du stade physiologique dans la réponse toxique. Le travail présent permet de ranger le penconazole parmi la gamme des agents du stress chimique environnemental qui agissent indépendamment du stade métabolique, et laisse prévoir une influence de la taille de la population. A partir d'une proportion concentration cellulaire/concentration du toxique, les cellules seraient « immunes » envers le penconazole car la quantité relative du penconazole par cellule serait beaucoup moindre par rapport aux cultures exposées lors de l'inoculation. Cabral *et al* (2003) ont souligné une augmentation de la concentration minimale inhibitrice parallèlement à l'augmentation de la taille de la population exposée. La taille de la population étant aussi un facteur d'influence vis-à-vis de la cytotoxicité, il serait intéressant d'exposer des cultures de tailles identiques mais appartenant à des stades physiologiques différents, afin de pouvoir trancher complètement de l'effet des stades métaboliques dans ce contexte.

Par contre, le stade physiologique intervient clairement dans la formation d'adduits à l'ADN qui apparaissent seulement dans les cultures exposées durant leur phase de croissance active, soulignant cette fois les différences métaboliques existant entre les stades physiologiques considérés. Cette mise en évidence d'adduits à l'ADN chez les deux levures témoigne de la génotoxicité du penconazole, le paragraphe suivant présente l'analyse et la quantification de ces adduits.

2.2. Génotoxicité du penconazole

Le penconazole ou 1-[2-(2,4dichlorophényl) n-pentyl] -1-H-1,2,4 triazole (formule moléculaire $C_{13}H_{15}Cl_2N_3$), est un fongicide hautement efficace largement utilisé pour le contrôle phytosanitaire des fruits (pomme, vigne, orange, et autres) et légumes et de certaines plantes ornementales. Absorbé par les feuilles et les organes herbacés des végétaux, il est doté de propriétés systémiques, et est actif à l'égard de nombreux champignons (Geahchan et Abi Zeid Daou, 1995; Sun *et al*, 2004). La littérature scientifique rapporte des données concernant l'application du penconazole, la persistance et la distribution de ses résidus ainsi que quelques effets d'écotoxicité (Arauz *et al*, 1990; Watters et Sturgeon, 1991 ; Rueegg et Siegfried, 1996 ; Navarro *et al*, 1999, 2000 ; Cuthbertson et Murchie, 2003 ; Ortelli *et al*, 2005) et de cytotoxicité (Ribeiro *et al*, 2000), mais ne fournit pas des études de génotoxicité.

La majorité des produits chimiques environnementaux sont mutagènes et carcinogènes suite à leur activation métabolique par un système enzymatique cytochrome P450, donnant des métabolites réactionnels qui peuvent former des adduits à l'ADN (Pfohl-Leszkowicz, 1994 a et b). De nombreux pesticides sont cités pour leur activité contre l'ADN dans des essais toxicologiques *in vivo* sur des animaux, des microorganismes, des cellules animales ou humaines (Bolognesi *et al*, 1994 ; Goin et Mayer, 1995 ; Dubois *et al*, 1996, 1997 ; Peluso *et al*, 1998 ; Reyes *et al*, 2002), et dans des études *in vitro* à l'aide de mélanges d'enzymes et de matériel génétique (Shah *et al*, 1997 ; Nelson et Ross, 1998 ; Lin *et al*, 2001, 2002). En outre l'exposition aux pesticides induit la formation d'adduits à l'ADN dans les cellules sanguines des personnes travaillant dans la floriculture (Munnia *et al*, 1999), et dans le placenta des femmes exposées à des organochlorés (Lagueux *et al*, 1999). Par ailleurs, les levures, surtout *S. cerevisiae*, ont souvent servi à élucider divers mécanismes de toxicités des pesticides, tel que le stress oxydatif (Sohn *et al*, 2004), les pertes de chromosomes (Goin et Mayer, 1995), la formation d'intermédiaires électrophiles réactifs (Wang *et al*, 2002 ; Rodriguez *et al*, 2004), mais aucune formation d'adduits à l'ADN dans un système levurien n'a été caractérisée.

Le but du présent travail était d'évaluer le potentiel génotoxique du penconazole en termes d'adduits à l'ADN chez *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*, surtout que ce pesticide a manifesté une cytotoxicité élevée envers les deux levures traduite par une inhibition de leur croissance et capacité fermentaire. Parmi toutes les modalités d'exposition au toxique adoptées, apport de plusieurs doses de penconazole (1-15 LMR) avant l'inoculation et d'une dose unique (10 LMR) à différents temps de la croissance (4 h, 12 h et 24 h), des adduits à l'ADN ont été détectés uniquement dans les cultures exposées en phase exponentielle de croissance des deux levures.

2.2.1. Détection et dosage des adduits à l'ADN chez les deux levures

L'apport du penconazole (10 LMR) après 4 h de l'inoculation entraîne la formation d'adduits à l'ADN chez les deux levures. Les adduits sont présents à partir de 4 h de contact pesticide-levures (8 h de l'inoculation), ils augmentent (surtout l'adduit 1) jusqu'à 16 h de contact et disparaissent après (Figure 14). Le profil d'adduits n'est pas totalement identique entre les deux types de levures. On constate la formation d'essentiellement 4 adduits individuels avec *M. pulcherrima* (figure 14 f) ; 2 avec *S. cerevisiae*. (figure 14 f).

Les nombres d'adduits donnés représentent les moyennes obtenues sur deux répétitions simultanées (duplicats de marquage) (tableau 4).

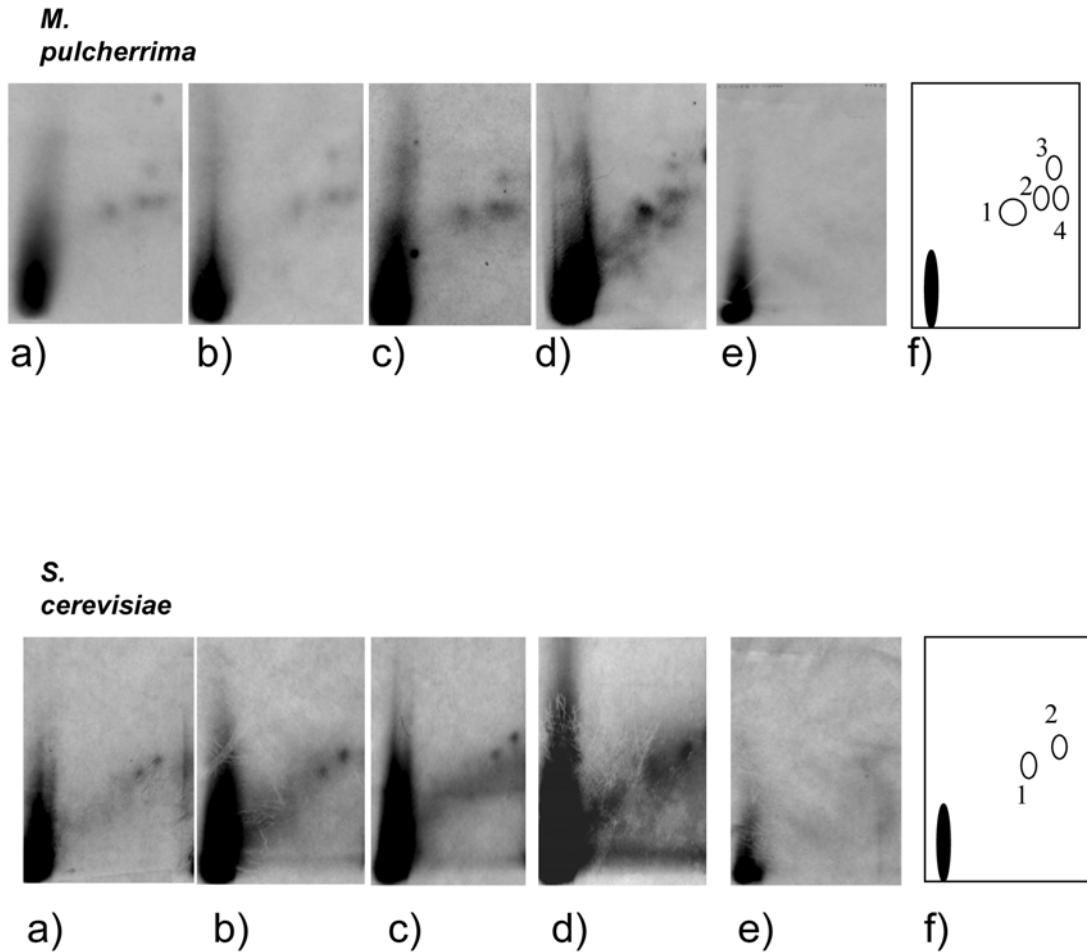


Figure 14 : Effet du penconazole (10 LMR) en apport au temps 4 h de la croissance sur la formation d'adduits à l'ADN chez *S. cerevisiae* et *M. pulcherrima* après plusieurs temps de contact avec le pesticide a) 4 h, b) 8 h, c) 12 h, d) 16 h, e) témoin exempte de pesticide et f) Représentation schématique

Tableau 4 : Nombre total d'adduits/ 10^9 nucléotides aux différents temps de contact pour les deux levures suite au traitement par le penconazole (10 LMR) après quatre heures de l'inoculation

Nombre d'adduits à l'ADN (adduit/ 10^9 nucléotides)				
Temps de contact (h)	4	8	12	16
<i>M. pulcherrima</i>	21,8	28	30,2	45,5
<i>S. cerevisiae</i>	20,9	35,8	40,3	54,9

2.2.2. Discussion

Ce travail a montré la génotoxicité du penconazole à travers la formation d'adduits à l'ADN chez *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*. Les adduits à l'ADN ne sont pas présents à tous les temps de

contact testés, mais on peut plutôt noter une « cinétique d'adduction » qui accompagne en quelque sorte la cinétique de croissance. Les adduits sont formés à partir de 4 heures de contact avec le toxique, augmentent après huit et douze heures et atteignent un pic après seize heures, mais disparaissent plus tard. Cette adduction ne perturbe pas le comportement cellulaire, la croissance se passe normalement ; or la réplication qui se déroule en présence des adduits, en les dépassant, a été très démontrée (Baynton *et al*, 1998 ; Guo *et al*, 2004 ; Bedard et Massey, 2006), ainsi que l'absence de corrélation entre la formation d'adduits à l'ADN et le comportement cellulaire (Amat-Bronnert, 2004).

On ne possède pas des informations antérieures concernant l'adduction à l'ADN chez les levures afin de pouvoir comparer et analyser. Cependant, la formation des adduits et leur intensité sont la résultante de deux facteurs : l'activité de métabolisation (bio-activation/détoxification), et la réparation génétique, auxquels peut s'ajouter dans notre cas l'effet dilution dû à l'augmentation exponentielle de la taille de la population.

On ne connaît rien aussi du métabolisme du penconazole. Les réactions qui aboutissent à la formation des adduits, les voies métaboliques empruntées, les systèmes enzymatiques impliqués et aussi les intermédiaires formés sont tous inconnus. Mais en général, l'activité de métabolisation dépend en grande partie des systèmes enzymatiques cytochrome P450. Les monooxygénases à cytochrome P450 des mycètes sont des complexes multienzymatiques localisés surtout dans le réticulum endoplasmique et les membranes mitochondriales. En présence de substances exogènes les CYPs catalysent un très grand nombre de biotransformations qui se distinguent notamment par l'activité biologique éventuelle du produit obtenu : certains CYPs facilitent l'élimination du composé initial par l'ajout de groupements polaires, une étape de conjugaison peut suivre et achever ce mécanisme de detoxification initié par le CYP, alors que d'autres sont impliqués dans l'activation de xénobiotiques en métabolites électrophiles qui peuvent former des adduits covalents aux bases de l'ADN. Leur profil d'expression varie entre les espèces, et leur expression peut être inductible ou constitutive (King *et al*, 1984 ; Cerniglia, 1984, 1992 ; Torres *et al*, 1995 ; Van Den Brink *et al*, 1998). En général, la complexité des phénomènes d'induction des enzymes du métabolisme fait qu'il existe un équilibre entre l'activation métabolique et la detoxification du xénobiotique ; cela détermine le degré de la réponse génotoxique (Cerniglia, 1984). Dans notre cas, le nombre d'adduits qui augmente pendant les premières 16 heures de contact malgré l'augmentation exponentielle de la biomasse souligne une forte activité de bio-activation du penconazole aboutissant à la formation des adduits à l'ADN. Ceci confirme les études antérieures qui ont démontré l'utilité des levures en tant que support pour l'évaluation des toxicités basées sur l'électrophilie des substances et la recherche de leurs interactions avec les biomolécules riches en électrons (Wang *et al*, 2002 ; Rodriguez *et al*, 2004). D'ailleurs, la formation d'adduits à l'ADN dans des cultures contaminées à partir de leur phase exponentielle apparaît en accord avec la synthèse active des cytochromes durant cette phase dans les cultures fermentaires, et leur utilisation par la cellule (Salmon *et al*, 1998). Lorsque la population atteint sa taille maximale, donc à partir de la phase stationnaire (environ 24 h), la teneur en cytochromes cellulaires diminue (Salmon *et al*, 1998), ce qui peut entraîner une baisse de l'activité de métabolisation, ces systèmes enzymatiques étant les plus impliqués dans de telles conversions.

En outre, les levures possèdent des systèmes de réparation actifs durant tout le cycle cellulaire mettant en œuvre les systèmes NER (GGR et TCR) et BER, similaires aux systèmes des eucaryotes supérieurs (Girard *et al*, 1997, 1998 ; Prakash et Prakash, 2000 ; Bedard et Massey, 2006). Effectivement, la disparition totale des adduits à partir de 20 heures de contact témoigne d'une réparation génétique très active combinée avec la baisse de l'activité de métabolisation.

Quant à la croissance de la population, elle ne semble pas influencer l'intensité des adduits et aucun phénomène de dilution des adduits n'a été noté. Au contraire, les adduits ne diminuent pas au fur et à mesure que la biomasse augmente, cette augmentation semble compensée par la forte activité de métabolisation pendant les 16 premières heures de contact.

Nos deux levures ont prouvé une capacité de former des adduits à l'ADN, d'intensité voisine, mais de profil schématique différent reflétant des divergences métaboliques entre elles. *M. pulcherrima* présente quatre types d'adduits différents alors que *S. cerevisiae* présente deux types d'adduits. Jusqu'à présent on ne peut pas trancher de la présence ou non d'adduits identiques communs aux deux levures. Des profils d'adduits complètement différents ont souvent été mis en évidence dans les expérimentations sur les cellules animales et les animaux multicellulaires entre les espèces, races et sexes du même animal. Ces différences reflètent les divergences des métabolismes des xénobiotiques, notamment la régulation des cytochromes P450 impliqués, qui déterminent les mécanismes d'activation/détoxification aboutissant ainsi à des carcinogènes différents, et de l'activité de réparation de la cellule (Dubois *et al*, 1995, 1996, 1997 ; Faucet-Marquis ; 2005). *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* appartiennent à deux genres différents et aussi deux types différents, la première favorise le métabolisme respiratoire même pendant les cultures fermentaires, alors que *S. cerevisiae* possède un métabolisme oxydatif de capacité moindre, mais présente néanmoins plusieurs voies de respiration durant les cultures fermentaires ainsi qu'une activité de ses cytochromes mitochondriaux (Salmon *et al*, 1998). Déjà une différence entre les réponses cytotoxiques de nos levures en cas d'exposition au toxique dès l'inoculation a été prouvée dans les parties précédentes. Les divergences métaboliques entre ces deux levures ne sont pas complètement identifiées, mais c'est clair qu'une différence au niveau du métabolisme des xénobiotiques existe entre elles. Zaripov *et al* (2002) ont démontré que les voies métaboliques impliquées dans la dégradation des substances exogènes chez les levures sont directement corrélées au type métabolique, ceci en étudiant les divergences au niveau du métabolisme des composés nitroaromatiques entre des espèces de la levure respiratoire *Candida* et des espèces *Saccharomyces*. En effet, pour les mêmes conditions de culture, ils ont obtenu des produits de dégradation différents, provenant majoritairement d'une hydrogénation du cycle aromatique chez *Candida* sp., alors que chez *Saccharomyces* sp. la réaction prédominante est une réduction du groupe nitro.

Nos données concernant les effets génotoxiques induits dans le système expérimental levurien en termes d'adduits à l'ADN suggèrent un risque génétique suite à l'exposition au penconazole, et représentent une contribution importante à la définition du profil génotoxique de ce fongicide.

3. Synthèse et discussion sur les études de toxicités des pesticides

Les pesticides possèdent un complexe de particularités spécifiques qui les distinguent des autres agents chimiques utilisés par l'Homme, qui comprend principalement leur introduction intentionnelle dans l'environnement, leur inévitable circulation dans la biosphère, la possibilité d'exposition de très larges populations ainsi que leur haute réactivité biologique.

Avant leur mise en marché et leur utilisation courante, les pesticides subissent un nombre de tests qui aboutissent à l'élimination des composés jugés comme dangereux pour les humains ; la carcinogénicité et la génotoxicité étant les premières propriétés recherchées.

Malgré cela, de nombreuses matières actives très répandues et déclarées à faible risque sont souvent trouvées cytotoxiques, génotoxiques, carcinogènes, mutagènes ou autres, dans les tests toxicologiques divers réalisés au laboratoire ; un seul groupe chimique pouvant agir à travers plusieurs mécanismes différents.

Dans le présent travail nous avons essayé de fournir une estimation de la toxicité de certains pesticides couramment utilisés dans les traitements chimiques des denrées alimentaires, notamment le penconazole ; et ceci à travers une étude de cytotoxicité et génotoxicité réalisée à l'aide de systèmes expérimentaux levuriens.

Un screening initial pour l'évaluation de la sensibilité de *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* vis-à-vis du chlorpyrifos-méthyle, diméthoate, penconazole, benomyl, azinphos-méthyle, et cyhéxatin a révélé une toxicité élevée du penconazole, benomyl et cyhéxatin, et la définition des paramètres IC₅₀ a permis de choisir le penconazole pour le reste de l'étude.

Ensuite on a utilisé le taux de croissance (ou le temps de génération), la productivité en biomasse et en éthanol et la vitesse de consommation des sucres comme indicateurs de l'effet toxique global du penconazole sur l'activité métabolique des cellules. Ces paramètres ont permis de dégager des données préliminaires concernant la toxicité, c'est une action toxique sévère mais différentielle qui dépend du type métabolique de levure et aussi des conditions de culture, mettant en évidence une sensibilité plus élevée de *M. pulcherrima*. Un dosage des résidus de penconazole a montré la capacité des deux levures à prélever le penconazole, ce qui nous incite à chercher la possibilité d'une réaction avec les structures cellulaires internes.

Par la suite, l'étude de cytotoxicité à travers les paramètres cinétiques tel que la vitesse de croissance moyenne et la quantité de biomasse maximale, a été accompagnée d'une recherche des adduits à l'ADN, biomarqueurs de génotoxicité. Cette étude a permis la mise en évidence de la formation d'adduits à l'ADN chez les deux levures suite à l'exposition au penconazole, indépendamment de l'effet observé sur le comportement cellulaire ; soulignant les activités levuriennes de métabolisation des xénobiotiques et de réparation génétique. La cytotoxicité du penconazole dépend surtout du type métabolique de levure et de la taille de la population exposée, alors que sa génotoxicité est plutôt liée au stade métabolique. Le penconazole est bio-activé par les levures pour former des adduits à l'ADN seulement lorsque le contact avec le toxique a lieu pendant la phase exponentielle de croissance.

La littérature ne rapporte pas des études claires concernant la formation d'adduits à l'ADN dans un modèle cellulaire levurien, mais des données indirectes souvent déduites à partir d'expérimentation non concluante, tel que la caractérisation chez les levures des réactions de bioconversions et de défense (activation/détoxification) et des équipements enzymatiques correspondants (Sutherland, 1992 ; Torres *et al*, 1995 ; Van Den Brink *et al*, 1998 ; Bedard et Massey, 2006), les études des systèmes levuriens de réparation génétique (Girard *et al*, 1997, 1998 ; Prakash et Prakash, 2000 ; Kong et Svejstrup, 2002), et les études de toxicités basées sur l'électrophilie des substances exogènes, de leurs métabolites intermédiaires, et leur réactivité avec les sites cibles (Wang *et al*, 2002 ; Rodriguez *et al*, 2004).

La présente investigation a permis la mise en évidence des toxicités des pesticides, plus particulièrement le penconazole, assurant la détection et le dosage d'adduits à l'ADN et l'étude de la cytotoxicité à l'aide du système levurien *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* ; le potentiel de ce système expérimental de former un test alternatif ou complémentaire dans les études de toxicités mérite des recherches supplémentaires. En effet, le métabolisme du penconazole étant complètement inconnu, une étude basée sur le même modèle expérimental levurien mais avec des molécules considérées comme référence en matière de formation d'adduits à l'ADN, pourra apporter plus de lumière sur l'adduction à l'ADN chez les levures et confirmer ainsi la validité du système cellulaire considéré.

CHAPITRE IV

VALIDATION DU MODELE CELLULAIRE

1. Introduction

L'élément critique de tout plan expérimental est la sélection du modèle qui servira pour tester l'hypothèse ; la signification biologique, la commodité, la reproductibilité, la stabilité, et le coût, étant parmi les facteurs majeurs considérés. La recherche toxicologique dépend largement de l'utilisation des animaux, désormais les études plus récentes portent sur le développement de méthodes alternatives, efficaces, et peu coûteuses pour l'estimation des toxicités, tel que les bio-essais fondés sur les cellules animales et les microorganismes.

Les levures, en tant qu'eucaryotes sont potentiellement un modèle pertinent pour représenter les organismes eucaryotes supérieurs dans les études de toxicités. La croissance, la physiologie, la biochimie et la génétique des levures, surtout *S. cerevisiae*, ont été considérablement étudiées, ce qui les rend un matériel convenable pour l'expérimentation. D'un point de vue pratique elles présentent de nombreux avantages puisqu'elles sont facilement cultivées et maintenues dans les conditions du laboratoire. En plus, les levures peuvent survivre dans les conditions anaérobies permettant de réaliser des tests non praticables avec les organismes supérieurs (Galzy, 1993 ; Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996 ; Goffeau *et al*, 1996 ; Ballatori et Villalobos, 2002 ; Rodriguez *et al*, 2004 ; Dolinski et Botstein, 2006).

Effectivement, les levures ont déjà beaucoup servi pour examiner diverses toxicités induites par des substances chimiques et toxines naturelles, telles que les inhibitions enzymatiques, la destruction des systèmes membranaires, les interactions avec les sites cibles, le stress oxydatif, les recombinaisons génétiques, et les pertes de chromosomes (Pelkonen *et al*, 1994 ; Goin et Mayer, 1995 ; Sengstag *et al*, 1997 ; Masia *et al*, 1998 ; Ribeiro *et al*, 2000 ; Poli *et al*, 2002 ; Wang *et al*, 2002 ; Cabral *et al*, 2003 ; Fujita *et al*, 2003 ; Ueda *et al*, 2003 ; Sohn *et al*, 2004 ; Rodriguez *et al*, 2004 ; Bergauer *et al*, 2005). En outre, les levures possèdent un set enzymatique leur permettant d'effectuer des réactions de bioconversions des xénobiotiques par des transformations similaires à celles connues en pharmacologie en tant que réactions de la phase 1 et 2 ; les métabolismes levuriens des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des aflatoxines sont bien connus (Cerniglia, 1984, 1992 ; Sutherland, 1992 ; Torres *et al*, 1995 ; Van Den Brink *et al*, 1998 ; Bedard et Massey, 2006). D'ailleurs ces substances exogènes deviennent génotoxiques seulement après leur bio-activation par les enzymes du métabolisme, notamment les systèmes biocatalytiques cytochrome P450, donnant des métabolites électrophiles réactionnels qui peuvent former des adduits à l'ADN (Pfohl-Leszkowicz, 1994 a et b ; Dubois *et al*, 1995, 1996, 1997).

La capacité de *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* à métaboliser le penconazole en composés génotoxiques, et la formation d'adduits à l'ADN dans ce système levurien ont été prouvés dans le chapitre 3.

Dans le chapitre présent, nous avons utilisé deux toxiques considérés comme référence en matière d'adduction à l'ADN pour examiner la formation d'adduits dans notre système cellulaire levurien. Le benzo(a)pyrène, HAP modèle, et l'aflatoxine B₁, la plus importante parmi les aflatoxines tant du point de vue fréquence que du point de vue toxicité, sont deux cancérogènes génotoxiques dont le métabolisme a été élucidé chez les levures et dont l'adduction à l'ADN n'est plus à démontrer (Sutherland, 1992 ; Wang et Groopman, 1999 ; Kozack *et al*, 2000 ; Guo *et al*, 2005, 2006 ; Jeffrey and Williams, 2005). La caractérisation de leurs adduits chez *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* permettra de valider ce modèle cellulaire dans le contexte de la formation d'adduits à l'ADN.

2. Matériel et méthodes

- Matériel chimique : aflatoxine B₁ et benzo(a)pyrène
- Matériel biologique : *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*

- Cultures fermentaires et essai en respiratoire
- Evaluation de la biomasse levurienne
- Détection et dosage des adduits à l'ADN par la méthode du postmarquage au ^{32}P

3. Résultats

3.1. Cultures fermentaires

Parmi toutes les modalités d'exposition au toxique adoptées dans la partie précédente, apport de plusieurs doses de penconazole (1-15 LMR) avant l'inoculation et d'une dose unique (10 LMR) à différents temps de la croissance (4 h, 12 h et 24 h), on a gardé pour cette partie les deux modes d'exposition qui ont entraîné un effet toxique. Pour cela, On a exposé les cultures de *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* à 0,2 et 2 ppm de benzo(a)pyrène et d'aflatoxine B₁, dès l'inoculation et durant leur phase de croissance exponentielle ; ces concentrations correspondant respectivement à la dose minimale et la dose maximale de la gamme qu'on avait appliquée pour le test avec le penconazole (LMR et 10 LMR).

3.1.1. Cinétiques de croissance

M. pulcherrima et *S. cerevisiae* sont résistantes à la présence du benzo(a)pyrène et de l'aflatoxine B₁, les cultures exposées dès l'inoculation ou après 4 h ne sont pas affectées par la présence de l'un ou l'autre des deux toxiques, mais présentent une croissance normale similaire au témoin ; et ceci pour les deux concentrations testées, 0,2 et 2 ppm (figures 15 et 16).

3.1.1.1. Exposition au toxique à $t = 0$

Malgré la présence de l'un ou l'autre des deux toxiques, aucun effet n'a été noté lors de l'exposition des cultures dès l'inoculation (figure 15). Les paramètres cinétiques adoptés comme critères de comparaison des différentes cultures fluctuent autour des valeurs témoins (tableau 5).

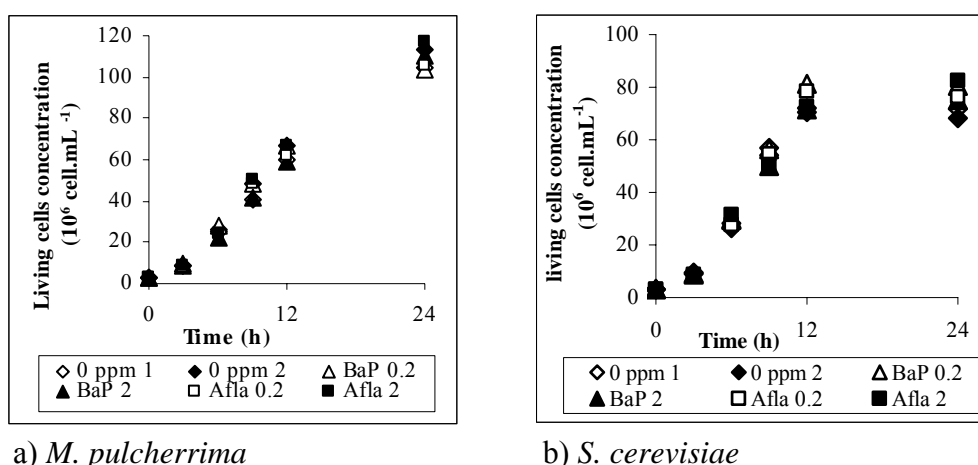


Figure 15 : Effet du B(a)P et de l'aflatoxine B₁ (0,2 et 2 ppm) en apport avant l'inoculation sur les cinétiques de croissance de (a) *M. pulcherrima* et (b) *S. cerevisiae*

Tableau 5 : La biomasse finale produite et la vitesse de croissance moyenne des deux levures obtenues suite à l'exposition à 0,2 et 2 ppm d'AFB₁ et de B (a)P dès l'inoculation

	B(a)P 0,2	B(a)P 2	AFB ₁ 0,2	AFB ₁ 2	témoin
<i>M. pulcherrima</i>					
ΔX_{max} (*10 ⁶ cell.mL ⁻¹)	101	107	102	114	101
r_x (*10 ⁶ cell.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	4,2	4,4	4,3	4,7	4,2
<i>S. cerevisiae</i>					
ΔX_{max} (*10 ⁶ cell.mL ⁻¹)	77	72	76	79	73
r_x (*10 ⁶ cell.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	3,2	3	3,2	3,3	3

3.1.1.2. Exposition au toxique à t = 4 h

Les différentes cultures exposées durant leur phase exponentielle de croissance ne sont pas non plus affectées ni par l'aflatoxine B₁ ni par le B(a)P (figure 16). ΔX_{max} et r_x reflètent là aussi les similitudes entre toutes les croissances (tableau 6). *S. cerevisiae* n'a pas reçu le traitement par l'AFB₁ pour des raisons matérielles, mais le travail sera fait très prochainement.

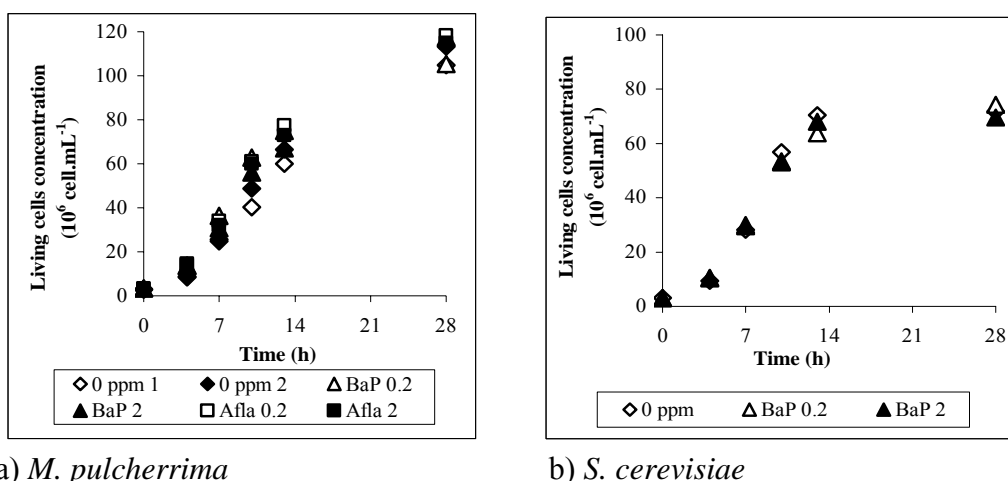


Figure 16 : Effet du B(a)P et de l'aflatoxine B₁ (0,2 et 2 ppm) en apport après 4 h de l'inoculation sur les cinétiques de croissance de (a) *M. pulcherrima* et (b) *S. cerevisiae*

Tableau 6 : La biomasse finale produite et la vitesse de croissance moyenne des deux levures obtenues suite à l'exposition à 0,2 et 2 ppm d'AFB₁ et de B (a)P après 4 h de l'inoculation

	B(a)P 0,2	B(a)P 2	AFB ₁ 0,2	AFB ₁ 2	témoin
<i>M. pulcherrima</i>					
ΔX_{max} (*10 ⁶ cell.mL ⁻¹)	102	114	115	111	110
r_x (*10 ⁶ cell.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	4,2	4,8	4,8	4,6	4,6
<i>S. cerevisiae</i>					
ΔX_{max} (*10 ⁶ cell.mL ⁻¹)	71,3	66,5	-	-	67
r_x (*10 ⁶ cell.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	3	2,8	-	-	2,8

3.1.2. Etude moléculaire

3.1.2.1. Test au Benzo(a)pyrène

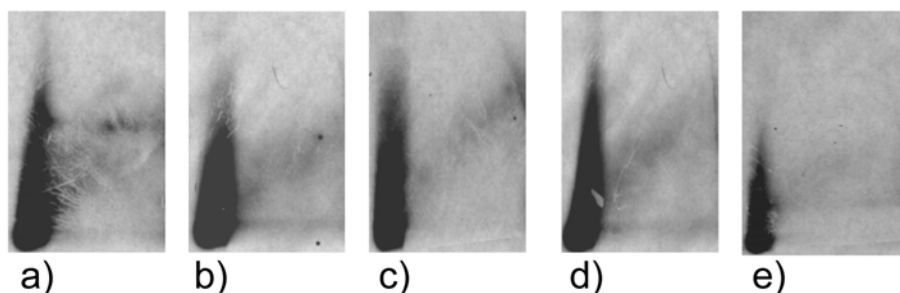
Le B(a)P entraîne la formation d'adduits à l'ADN chez les deux levures, dans les cultures exposées dès l'inoculation et durant leur phase de croissance exponentielle, et pour les deux doses testées. Les adduits sont visibles sous forme d'une zone diagonale radioactive (DRZ) (figure 18). Les adduits sont plus nombreux lors de l'exposition durant la phase exponentielle de croissance et pour la concentration 0,2 ppm par rapport à la deuxième concentration testée qui est 10 fois plus grande (2 ppm). Les adduits sont présents à partir de trois heures de contact toxique-levures, ils diminuent progressivement ensuite disparaissent complètement pendant les heures suivantes. Ces observations sont relevées chez les deux levures, pour les deux doses et les deux modes d'exposition au B(a)P, mais avec des intensités différentes à chaque fois.

a) *M. pulcherrima*

Des adduits à l'ADN ont été obtenus suite à l'addition du B(a)P avant l'inoculation (figure 17, tableau 7) et en cours de la phase de croissance exponentielle (figure 18, tableau 8). Les adduits sont présents à partir trois heures de contact, ils diminuent à 6, 9 et 12 heures et sont totalement absents à 24 heures. On peut les distinguer sous forme d'une zone diagonale radioactive (figures 17 et 18).

Exposition dès l'inoculation

2 ppm



0,2 ppm

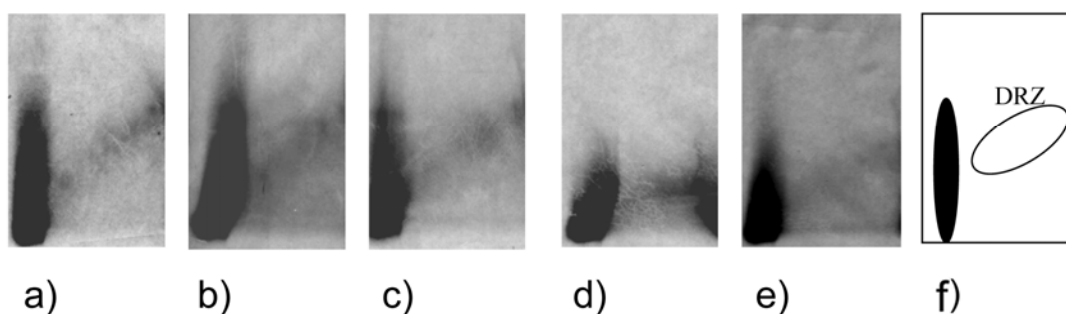


Figure 17 : Formation d'adduits à l'ADN chez *M. pulcherrima* suite à l'addition du B(a)P avant l'inoculation suivant les deux doses 0,2 et 2 ppm, après les temps de contact a) 3 h, b) 6 h, c) 9 h, d) 12 h, e) témoin sans traitement et f) Représentation schématique

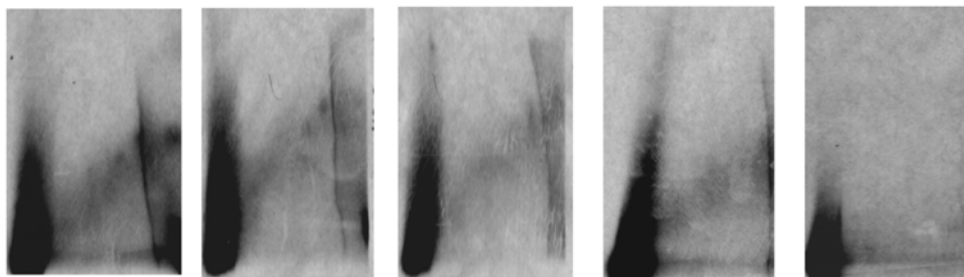
Tableau 7 : Nombre total d'adduits à l'ADN (Nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides) obtenus aux différents temps de contact avec *M. pulcherrima* suite au traitement par le B(a)P (2 et 0,2 ppm) avant l'inoculation

Nombre d'adduits à l'ADN (adduit/ 10^9 nucléotides)				
Temps de contact (h)	3	6	9	12
2 ppm	30	26,3	20,3	13,8
0,2 ppm	35	31,6	31,8	30

Le taux total d'adduit à l'ADN est plus important lors du traitement des levures par la faible dose de B(a)P. On observe une disparition progressive des adduits au fil du temps surtout après traitement par la forte dose.

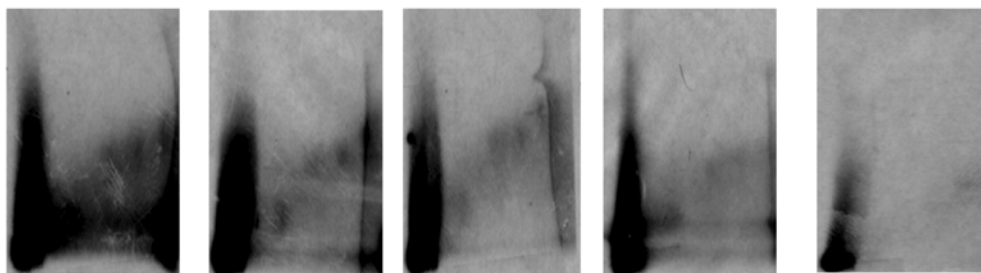
Exposition après 4 h de l'inoculation

2 ppm



a) b) c) d) e)

0,2 ppm



a) b) c) d) e)

Figure 18 : Formation d'adduits à l'ADN chez *M. pulcherrima* suite à l'addition du B(a)P après quatre heures l'inoculation suivant les deux doses 2 et 0,2 ppm, après les temps de contact a) 3 h, b) 6 h, c) 9 h, et d) 12 h, e) témoin sans traitement

Tableau 8 : Nombre total d'adduits à l'ADN (Nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides) obtenus aux différents temps de contact chez *M. pulcherrima* suite au traitement par le B(a)P (2 et 0,2 ppm) après quatre heures de l'inoculation

Nombre d'adduits à l'ADN (adduit/ 10^9 nucléotides)				
Temps de contact (h)	3	6	9	12
2 ppm	34,6	28,7	17,8	17
0,2 ppm	60,2	32,2	32,3	10,2

Nous constatons que comme précédemment, le nombre total d'adduit à l'ADN est plus important lors d'une exposition à la plus faible dose. Les adduits diminuent en fonction du temps.

b) *S. cerevisiae*

Les adduits ont aussi été obtenus suite à l'addition du B(a)P avant l'inoculation (figure 19, tableau 9) et en cours de la phase de croissance exponentielle (figure 20, tableau 10), ils sont présents à partir trois heures de contact sous forme d'une zone diagonale radioactive (figure 19 et 20), ils diminuent à 6, 9 et 12 heures et sont totalement absents à 24 heures.

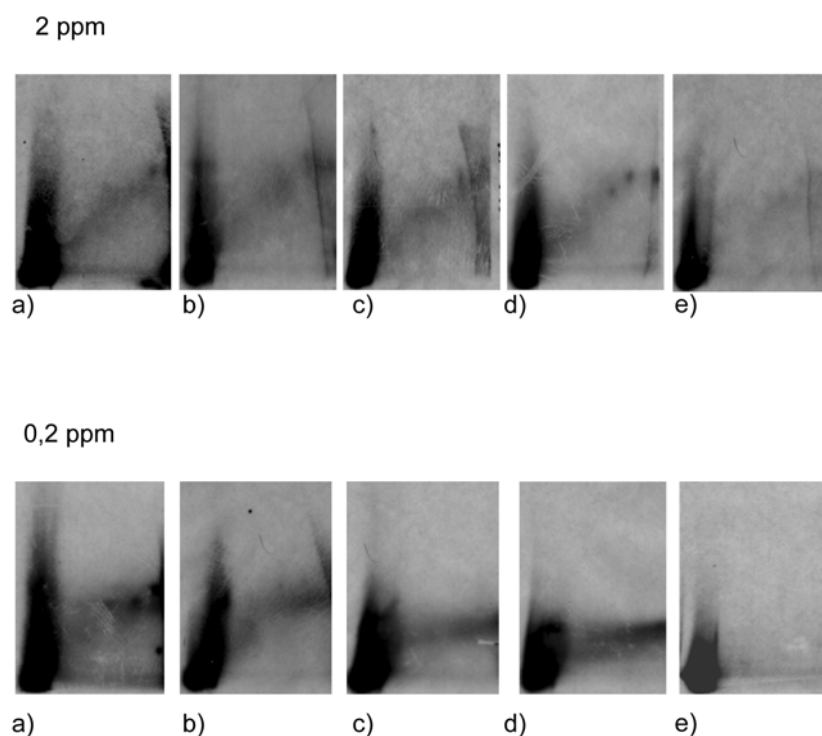
Exposition dès l'inoculation

Figure 19 : Formation d'adduits à l'ADN chez *S. cerevisiae* suite à l'addition du B(a)P avant l'inoculation suivant les deux doses 2 et 0,2 ppm, après les temps de contact a) 3 h, b) 6 h, c) 9 h, d) 12 h, e) témoin sans traitement

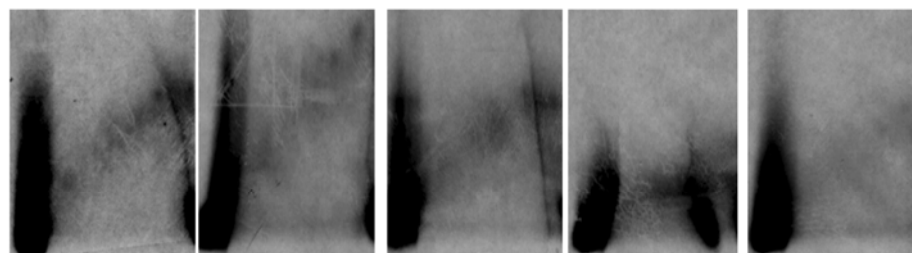
Tableau 9 : Nombre total d'adduits à l'ADN (Nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides) obtenus aux différents temps de contact avec *S. cerevisiae* suite au traitement par le B(a)P (2 et 0,2 ppm) avant l'inoculation

Nombre d'adduits à l'ADN (adduit/ 10^9 nucléotides)				
Temps de contact (h)	3	6	9	12
2 ppm	25,2	19,2	21,5	18,5
0,2 ppm	44,7	46,4	41,4	11

Le nombre d'adduit totaux est relativement stable au cours du temps d'incubation sauf après 12 h lors du traitement avec la faible dose. Nous constatons à nouveau une adduction plus importante lors d'un traitement à faible dose.

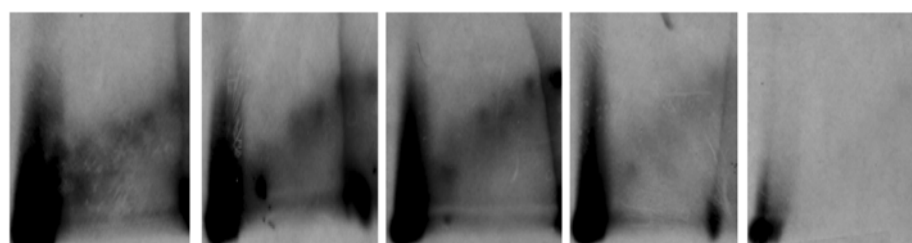
Exposition après 4 h de l'inoculation

2 ppm



a) b) c) d) e)

0,2 ppm



a) b) c) d) e)

Figure 20 : Formation d'adduits à l'ADN chez *S. cerevisiae* suite à l'addition du B(a)P après quatre heures de l'inoculation suivant les deux doses 2 et 0,2 ppm, après les temps de contact a) 3 h, b) 6 h, c) 9 h, et d) 12 h, e) témoin sans traitement

Tableau 10 : Nombre total d'adduits à l'ADN (Nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides) obtenus aux différents temps de contact avec *S. cerevisiae* suite au traitement par le B(a)P (2 et 0,2 ppm) après quatre heures de l'inoculation

Nombre d'adduits à l'ADN (adduit/ 10^9 nucléotides)				
Temps de contact (h)	3	6	9	12
2 ppm	31,7	29,7	26,2	27,3
0,2 ppm	46,7	29,5	25,6	21

Après traitement à la dose de 0,2 ppm le taux total d'adduit maximum est identique aux conditions précédentes (tableau 9), mais survient plus rapidement que précédemment puisque ce taux est atteint 3 h après le traitement alors que précédemment le maximum était atteint à 6 h. La disparition des adduits est aussi plus rapide, puisque trois heures après on observe deux fois moins d'adduits. Lors du traitement avec la dose de 2 ppm, on obtient plus d'adduits dans ces conditions

que lors de l'ajout immédiat au début de la culture (tableau 9). Il n'y a que peu de diminution au cours de douze premières heures.

Tableau 11 (récapitulatif): Nombre total d'adduits à l'ADN (nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides) obtenus après les différents traitements des deux levures par le B(a)P, et ceci pour différents temps de contact (3, 6, 9 et 12 h).

Nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides						
Levure	Temps D'exposition (h)	Dose (ppm)	3 h	6 h	9 h	12 h
<i>M. pulcherrima</i>	T = 0	2	30	26,3	20,3	13,8
		0,2	35	31,6	31,8	30
	T = 4	2	34,6	28,7	17,8	17
		0,2	60,2	32,2	32,3	10,2
<i>S. cerevisiae</i>	T = 0	2	25,2	19,2	21,5	18,5
		0,2	44,7	46,4	41,4	11
	T = 4	2	31,7	29,7	26,2	27,3
		0,2	46,7	29,5	25,6	21

3.1.2.2. Test à l'Aflatoxine B₁

L'Aflatoxine B₁ (0,2 et 2 ppm) a entraîné la formation d'adduits à l'ADN uniquement dans le cas d'apport de 2 ppm après quatre heures de l'inoculation chez *M. pulcherrima*. Ce test n'a pas été effectué avec *S. cerevisiae* pour des raisons matérielles, les résultats obtenus jusqu'à présent nous laissent présumer que *S. cerevisiae* aura le même comportement que *M. pulcherrima*, mais le travail se poursuit (figure 21).

Dans tous les autres cas (dose faible, apport avant l'inoculation), aucune formation d'adduits à l'ADN n'a été observée. A titre d'exemple, des autoradiogrammes obtenus pour *S. cerevisiae* sous l'effet de l'Aflatoxine B₁ (0,2 ppm, apport avant l'inoculation) sont donnés dans la figure 22.

a) *M. pulcherrima*

Des adduits à l'ADN ont été obtenus suite à l'addition de l'Aflatoxine B₁ (2 ppm) en cours de la phase de croissance exponentielle, les adduits sont présents à partir de trois heures de contact, ils augmentent à 6, 9 et 12 heures mais sont totalement absents à 24 heures. On peut distinguer essentiellement deux types d'adduits (Figure 21 ; tableau 12).

2 ppm

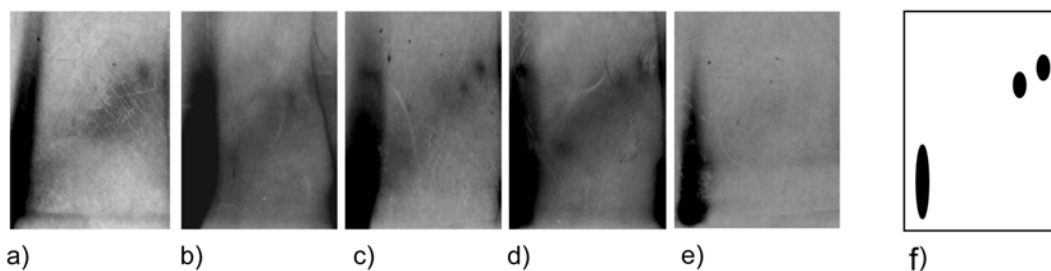


Figure 21 : Formation d'adduits à l'ADN chez *M. pulcherrima* sous l'effet de l'Aflatoxine B₁ (2 ppm) additionnée après quatre heures l'inoculation, après les temps de contact a) 3 h, b) 6 h, c) 9 h, d) 12 h, e) témoin sans aflatoxine, et f) Représentation schématique

Tableau 12 : Nombre total d'adduits à l'ADN (Nombre d'adduits/10⁹ nucléotides) obtenus aux différents temps de contact chez *M. pulcherrima* suite au traitement par l'Aflatoxine B₁ (2 ppm) après quatre heures de l'inoculation

Nombre d'adduits à l'ADN (adduit/10 ⁹ nucléotides)				
Temps de contact (h)	3	6	9	12
2 ppm	26,5	27,2	35,6	34

b) *S. cerevisiae*

Aucune formation d'adduits à l'ADN n'a été notée pour tous les traitements réalisés avec l'Aflatoxine B₁ pour cette levure (figure 22).

0,2 ppm

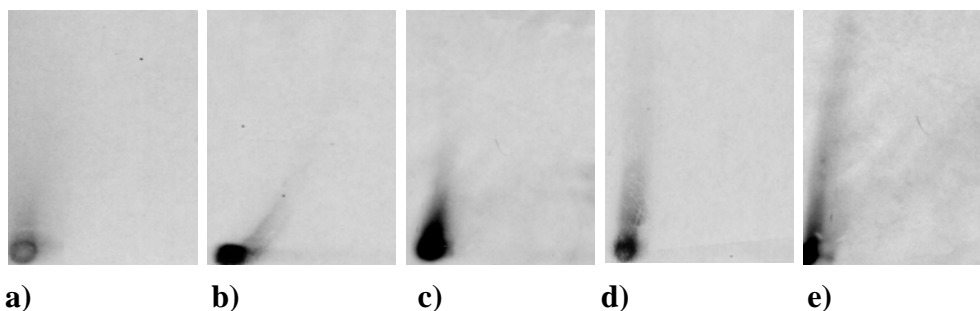


Figure 22 : Effet de l'apport de 0,2 ppm d'Aflatoxine B₁ avant l'inoculation sur la formation d'adduits à l'ADN chez *S. cerevisiae* après plusieurs temps de contact a) 3 h ; b) 6 h ; c) 9 h, et d) 12 h et e) témoin sans aflatoxine

3.2. Essai en respiratoire

Cet essai a été réalisé en culture respiratoire afin de tester la réponse génotoxique dans ces conditions. *S. cerevisiae* ($300 \times 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$) est exposée à 0,2 ppm de B(a)P après quatre heures de l'inoculation, cette concentration est choisie car elle a entraîné une formation d'adduits plus intense dans les conditions de cultures fermentaires. Les cultures ont été suivies pendant deux heures après la contamination par le toxique, vu la croissance rapide dans ces conditions.

L'apport du B(a)P (0,2 ppm) ainsi réalisé entraîne la formation d'adduits à l'ADN visibles après une demie heure de contact, ces adduits diminuent mais persistent durant les deux heures du suivi réalisé (figure 23). Les nombres d'adduits formés sont nettement plus faibles que ceux obtenu dans les conditions du métabolisme fermentaire avec la même levure, la même dose et suivant le même mode d'application du B(a)P (tableau 13). On constate essentiellement un adduit (figure 23).

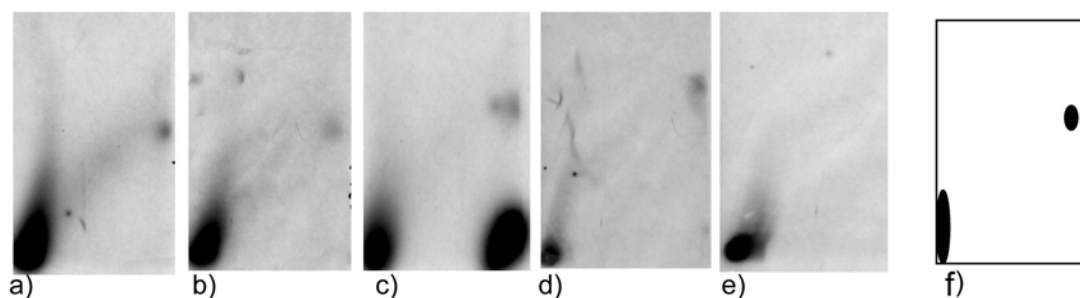


Figure 23 : Formation d'adduits à l'ADN chez *S. cerevisiae* (en métabolisme respiratoire) exposée à 0,2 ppm de B(a)P après quatre heures de l'inoculation après les temps de contact a) ½ h, b) 1 h, c) 1 h ½, d) 2 h, e) témoin non traité, et f) Représentation schématique

Tableau 13 : Nombre total d'adduits à l'ADN (Nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides) obtenus aux différents temps de contact chez *S. cerevisiae* (en métabolisme respiratoire) suite au traitement par le B(a)P (0,2 ppm) après quatre heures de l'inoculation

Nombre d'adduits à l'ADN (adduit/ 10^9 nucléotides)				
Temps de contact (h)	$\frac{1}{2}$	1	1, $\frac{1}{2}$	2
0,2 ppm	14,6	9,7	10,2	7,8

4. Discussion et conclusion

Cette étude avait pour but d'évaluer l'impact génotoxique de l'aflatoxine B₁ et du benzo(a)pyrène envers *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* par mesure des adduits à l'ADN par la méthode du postmarquage au ^{32}P , afin de fournir une référence en matière d'adduction à l'ADN dans le système levurien.

Les études sur le potentiel carcinogène des HAPs et des aflatoxines chez les animaux montrent le rôle des cytochromes P450, et plus particulièrement des CYPs 1A1 et 1B1 pour le benzo(a)pyrène et CYPs 1A2 et 3A4 pour l'aflatoxine B₁ (Guengerich, 2001 ; Faucet-Marquis, 2005). Ces enzymes sont inductibles, ils sont impliqués dans la bio-activation des HAPs et des aflatoxines en composés réactifs capables de former des adduits. Les deux types de levures possèdent au moins partiellement l'équivalent de ces activités. Le CYP levurien responsable de la dégradation du benzo(a)pyrène est parmi les rares CYPs levurien qui ont été purifiés. La caractérisation de ces CYPs par des techniques biochimiques étant compliquée par les difficultés de leur purification, ces CYPs possèdent un profil métabolique relativement similaire au profil métabolique des CYPs des mammifères (Cerniglia, 1984 ; Van den Brink *et al*, 1998). Pour cette raison, *S. cerevisiae* a déjà été utilisée pour les études moléculaires de ces systèmes enzymatiques à l'aide de gènes d'origines homologues ou hétérologues (Van den Brink *et al*, 1998).

La dégradation des xénobiotiques par les mycètes est largement étudiée car elle possède non seulement une signification toxicologique, mais aussi environnementale. En effet, à part les études de toxicités, de nombreuses recherches se sont occupées du métabolisme des xénobiotiques chez les levures dans le cadre de la dépollution par les microorganismes, et ces études étaient parfois décourageantes à cause de la toxicité et la réactivité des produits de dégradation obtenus (Cerniglia, 1984 ; Aksu, 2005 ; Kim *et al*, 2005). Le Benzo(a)pyrène est métabolisé par les CYPs levuriens, en phénols, trans-dihydrodiol, quinones et tétralones, sans oublier les intermédiaires époxydes et le benzo(a)pyrène trans-7,dihydrodiol 9,10-époxyde (BPDE), tous capables d'interagir avec les biomolécules riches en électrons et de former des adduits (King et Wiseman, 1987 ; Sutherland, 1992 ; Rodriguez *et al*, 2004 ; Bergauer *et al*, 2005). L'aflatoxine B₁ est bioactivée par époxydation de la double liaison du cycle furane terminal pour générer l'intermédiaire hautement réactif AFB₁-8,9-époxyde, qui peut réagir avec les acides nucléiques et les protéines (Bedard et Massey, 2006). Ces réactions sont similaires à celles trouvées chez les mammifères.

En outre, Rodriguez *et al* (2004) ont utilisé *S. cerevisiae* pour étudier la toxicité des quinones basée sur la formation de liaison covalente avec les biomolécules et/ou la réduction de l'oxygène moléculaire en superoxyde et autres espèces oxygénées réactives, sans toutefois chercher les adduits à l'ADN formés ; aussi Wang *et al* (2002) ont proposé les levures comme système pour l'étude des toxicités basées sur l'électrophilie et l'hydrophobicité des toxiques, mais l'étude réalisée consistait en un test indépendant des mécanismes exacts des réactions.

Dans la présente étude on a pu détecter et mesurer des adduits à l'ADN chez *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* par la méthode du postmarquage au ^{32}P sous l'effet du benzo(a)pyrène et de l'aflatoxine B₁. Ce dommage génotoxique n'entraîne aucune altération du comportement cellulaire, confirmant le découplage entre la cytotoxicité et la génotoxicité dans ce système.

Les deux levures ont présenté la capacité de métaboliser le B(a)P en plusieurs métabolites intermédiaires, le benzo(a)pyrène a généré une série d'adduits disposés sur la diagonale des autoradiogrammes ; ceci est noté pour les deux modes d'exposition au toxique et pour les deux doses. Les profils d'adduits obtenus sous l'effet du B(a)P et leurs intensités sont très variables entre les différents systèmes expérimentaux. En général, la zone diagonale radioactive est typique de la contamination par les HAPs (Shah et al, 1997 ; Schilderman *et al*, 1999 ; Amat-Bronnert, 2004). Les adduits sont présents après trois heures de contact avec le toxique et présentent leur intensité maximale à ce temps, ensuite ils diminuent aux temps six, neuf, et douze heures et sont absents à 24 heures. Cependant, les intensités sont plus fortes lors de l'exposition en phase de croissance exponentielle et aussi pour la concentration 0,2 ppm par rapport à la 2 ppm, ceci en considérant les nombres obtenus après 3 heures de contact qui correspondent aux premiers adduits détectés. Effectivement, lorsqu'on passe de l'exposition dès le début de l'inoculation à l'exposition après quatre heures de l'inoculation, pour *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* les adduits augmentent respectivement de 15 % et 26 % pour les 2 ppm, et 72 % et 4,5 % pour les 0,2 ppm. Cette intensité plus élevée de la réponse génotoxique dans les cultures exposées en leur phase exponentielle coïncide avec la synthèse active de cytochromes cellulaires pendant la phase de la croissance (Salmon *et al*, 1998), et souligne une fois de plus le rôle déterminant du stade métabolique dans la réponse génotoxique des deux levures. Inversement, pour un mode d'exposition donné, la comparaison entre les deux concentrations testées montre qu'en passant de 2 à 0,2 ppm, pour *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* les adduits augmentent respectivement de 16,7 % et 77,4 % dans le cas d'exposition au temps zéro, et 74 % et 47,3 % dans le deuxième cas. Il ne semble pas qu'une relation directe existe entre l'exposition au toxique et le niveau d'adduits, Amat-Bronnert (2004) avait obtenu, parmi sept doses allant de 250 ng.mL⁻¹ à 50 µg.mL⁻¹ d'extrait de pétrole testées sur des cellules hépatiques humaines, une réponse génotoxique d'intensité maximale pour la dose de 10 µg.mL⁻¹ située au milieu de la gamme. Dans les enquêtes biomonitoring chez les humains, Hemminki (1995) indique que les travailleurs des cokeries exposés à 1 µg/m³ de benzo(a)pyrène ne présentent pas un niveau d'adduits supérieur aux travailleurs des fonderies exposés à moins du dixième de la concentration mentionnée. Dans une étude concernant les lymphocytes des fumeurs, Dallinga *et al* (1998) ont observé que les adduits à l'ADN présentent une saturation pour un certain niveau d'exposition à partir duquel ces adduits n'augmentent plus ou augmentent très faiblement. Ceci s'explique par la balance existant entre les enzymes de métabolisation induites par le toxique et les enzymes de réparation. D'autre part, à des doses élevées le toxique peut aussi inhiber les enzymes de métabolisation, se traduisant finalement par une moindre formation d'adduits.

La diminution du nombre d'adduits en parallèle à la croissance proviendrait d'une dilution des adduits formés à cause du matériel cellulaire et génétique qui augmentent avec l'accroissement exponentiel de la population, mais aussi de l'activité de réparation génétique qui va entraîner la disparition totale de adduits à un moment donné entre 12 et 24 heures de contact (Girard *et al*, 1997, 1998 ; Prakash et Prakash, 2000 ; Bedard et Massey, 2006). Comme les enzymes de métabolisation, ces enzymes de réparation sont induites par le toxique.

Pour le moment, on ne peut pas déduire de la présence d'adduits identiques communs entre *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* pour trancher si le métabolisme du B(a)P donne les mêmes métabolites chez les deux levures, surtout que ces levures présentent des divergences métaboliques mises en évidence dans le chapitre précédent.

Par ailleurs, il serait intéressant de pouvoir classer le niveau de réponse génotoxique déclenchée dans notre système levurien par rapport à d'autres, mais la littérature ne fournit pas des recherches d'adduits dans un système levurien et la comparaison avec des supports expérimentaux

très différents tels que les lignées de cellules animales ou humaines, est assez difficile, les réponses varient énormément entre les divers systèmes. A titre d'exemple on peut citer Canova *et al* (1996) qui ont obtenu 144 adduits/ 10^9 nucléotides dans des lymphocytes humains utilisés comme témoin positif pour leur travail, pour une dose de B(a)P de 8 μ M (environ 2 ppm). Weber-Lotfi *et al* (1992) ont détecté deux types d'adduits comptant 120 adduits/ 10^9 nucléotides dans l'ADN nucléaire des grains d'haricot plantés en présence de 200 μ M de B(a)P. Amat-Bronnert (2004) a trouvé 870 adduits/ 10^9 nucléotides dans les cellules hépatiques humaines exposées à 25 ppm de B(a)P, par contre aucun adduit n'a été détecté dans les cellules épithéliales bronchiques humaines exposées à la même dose.

Concernant l'aflatoxine B₁, les adduits sont formés chez *M. pulcherrima* pendant la phase exponentielle de croissance à la concentration 2 ppm, ce qui rappelle les résultats obtenus avec les 2 ppm de penconazole testé dans le chapitre précédent ; démontrant encore une fois de la forte activité de métabolisation pendant ce stade physiologique par rapport aux autres (Salmon *et al*, 1998). Les adduits sont visibles après trois heures de contact, augmentent à six, neuf et douze heures et sont absents à 24 heures. Là aussi, l'activité de réparation levurienne serait responsable de la disparition des adduits, alors que l'accroissement de la taille de la population est compensé par un ratio bio-activation/réparation plus élevé que dans le cas du benzo(a)pyrène, mais pareillement au penconazole, ce qui entraîne les adduits à augmenter pendant les premières douze heures. Les adduits sont légèrement plus distincts que dans le cas du B(a)P, on peut distinguer essentiellement deux types d'adduits. Nombreuses questions demeurent encore sans réponse, par exemple, qu'est ce qui peut expliquer l'absence d'adduits dans le cas d'exposition au toxique au temps zéro, est-ce que ce serait lié à l'induction des CYPs impliqués, ou autre ? Est-ce que les similitudes entre l'adduction générée par le penconazole et celle par l'aflatoxine B₁ seraient au niveau des voies métaboliques empruntées, des enzymes, de leur induction ou leur profils métaboliques, des caractéristiques des adduits formés ?

En plus, dans tous les cas, les adduits disparaissent à un temps situé entre 12 (16 h pour le penconazole) et 24 heures de contact, ce temps coïncide avec la phase de ralentissement de croissance et le début de la phase stationnaire, période caractérisée par une chute de la teneur cellulaire en cytochromes lorsque la biomasse atteint sa taille maximale, et par divers changements métaboliques (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996 ; Salmon *et al*, 1998).

Il est généralement admis que, vu les niveaux relativement faibles des enzymes respiratoires et cytochromes mitochondriaux, la phosphorylation oxydative classique ne se produit pas d'une manière significative dans les conditions de culture fermentaire. Cependant, une synthèse relativement partielle des cytochromes mitochondriaux est observée durant la phase de croissance exponentielle, et la consommation d'oxygène par les levures est liée à l'opération de plusieurs voies respiratoires, alternatives de la respiration classique, et corrélées à la teneur cellulaire en cytochromes (Salmon *et al*, 1998). Des cultures respiratoires pourraient être mieux adaptées à la recherche des adduits du B(a)P et de l'AFB₁, leurs biotransformations dépendant du métabolisme oxydatif et de la disponibilité de l'oxygène moléculaire, qui sont relativement restreints en cultures fermentaires. Par la suite, un essai en respiratoire s'avère intéressant et permettra de comparer le comportement de nos cellules dans le travail déjà réalisé en conditions fermentaires, notamment l'intensité de la réponse génotoxique. *S. cerevisiae* étant le système levurien de référence (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996 ; Ribeiro *et al*, 2000 ; Ballatori et Villalobos, 2002 ; Hiraga *et al*, 2005 ; Dolinski et Botstein, 2006), nous l'avons choisie afin de réaliser un premier test de culture respiratoire avec le B(a)P qui a causé les adduits partout dans les conditions fermentaires.

S. cerevisiae a été exposée à 0,2 ppm de B(a)P après quatre heures de l'inoculation et dans des conditions qui la restreignent au métabolisme respiratoire. Des adduits ont été détectés pendant les deux heures du suivi effectué, ils sont plus distincts que dans le cas des cultures fermentaires, on observe un type d'adduits. Le même phénomène est observé, les adduits diminuent pendant que les cultures avancent, mais on ne détecte pas leur disparition, peut être un temps de contact de deux

heures ne suffit pas pour entraîner leur réparation totale. Un adduit apparaît seulement au temps une heure et demie, par la suite il a été réparé ou dilué jusqu'à un niveau non détectable. Les adduits obtenus dans les conditions fermentaires similaires (0,2 ppm B(a)p, *S. cerevisiae*, exposition au temps 4 h) semblent à première vue largement supérieurs (26,5 adduits/ 10^9 nucléotides), et représentent à peu près le double (1,8 fois plus) des adduits obtenus en respiratoire (14,6 adduits/ 10^9 nucléotides), cependant la population est 100 fois plus grande dans le dernier cas, donc le ratio toxique/cellule est 100 fois inférieur, ce qui revient à dire que la réponse génotoxique de *S. cerevisiae* en conditions respiratoires est 55 fois plus grande. Mais on ne peut pas spéculer sur la corrélation dose-réponse, cette dernière étant parmi les énigmes des études d'adduits à l'ADN, parfois les doses très fortes comme celles très faibles induisent le moins d'adduits, parfois c'est l'inverse ; pour cela, seule une gamme de concentrations pourra identifier la dose qui correspond à la meilleure réponse génotoxique du système expérimental utilisé (Amat-Bronnert, 2004).

En conclusion, nos données indiquent la formation d'adduits à l'ADN dans un système cellulaire levurien traité par le B(a)P et l'aflatoxine B₁, et suggèrent que les HAPs ainsi que les toxines naturelles peuvent causer des dommages à l'ADN chez *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*. Ainsi, ce système est un support approprié pour prouver cette génotoxicité. En outre, ce travail a souligné la contribution partagée du métabolisme des xénobiotiques et des systèmes de réparation levuriens à la détermination du profil de la réponse génotoxique et de son intensité.

CHAPITRE V

DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les pesticides forment un groupe important de substances chimiques qui peuvent contaminer l'écosystème aboutissant à l'exposition humaine (Urban et Cook/EPA, 1986 ; Rakitsky *et al*, 2000 ; McCarroll *et al*/EPA/OPP, 2002 ; Perera *et al*, 2005). Malgré les efforts pour développer des méthodes alternatives, les pesticides sont toujours le moyen de lutte prédominant et leurs résidus constituent une menace potentielle (Tsakiris *et al*, 2002, Akiyama *et al*, 2005 ; Aulakh *et al*, 2006). Il est donc pertinent que les pesticides soient examinés pour leur toxicité et génotoxicité. La génotoxicité résultant de la liaison covalente des xénobiotiques à l'ADN avait déjà été établie, et ces adduits à l'ADN résultant d'une telle liaison sont utilisés comme biomarqueurs de cette génotoxicité (Pfohl-Leszkowicz, 1994a ; Hemminki, 1995 ; Vainio, 1998, 2001 ; Shuker, 2002 ; Jeffrey & Williams, 2005). La détection des adduits par la technique du postmarquage de l'ADN au phosphore 32 est une méthode sensible, performante et liée à l'exposition aux substances chimiques environnementales. En outre, la formation d'adduits à l'ADN est considérée comme un événement initial du processus de mutagenèse et cancérogenèse, donc l'estimation de la génotoxicité offre un outil efficace dans l'évaluation de l'exposition humaine aux carcinogènes environnementaux et la détection des adduits à l'ADN constitue un avertissement précoce des effets possibles de cette exposition (Pfohl-Leszkowicz, 1994b ; Guengerich, 2001 ; Wogan *et al*, 2004).

Les pesticides ont été très cités pour leur cytotoxicité et génotoxicité dans les études toxicologiques (Bolognesi *et al*, 1994 ; Dubois *et al*, 1996, 1997 ; Lodovici *et al*, 1997 ; Peluso *et al*, 1998 ; Nelson et Ross, 1998 ; Dierickx, 1999 ; Lin *et al*, 2001, 2002 ; Forman *et al*, 2002) et les enquêtes concernant les personnes considérées à risque élevé (Geahchan et Abi Zeid Daou, 1995 ; Lagueux *et al*, 1999 ; Munnia *et al*, 1999). Les études concernant les toxicités des pesticides exploitent des systèmes expérimentaux divers, notamment le système levurien considéré actuellement parmi les modèles cellulaires de base en expérimentation toxicologique (Ahlers *et al*, 1991 ; Goin et Mayer, 1995 ; Masia *et al*, 1998 ; Ribeiro *et al*, 2000 ; Ballatori et Villalobos, 2002 ; Wang *et al*, 2002 ; Ueda *et al*, 2003 ; Sohn *et al*, 2004 ; Dolinski et Botstein, 2006).

L'objectif de notre travail était d'évaluer les toxicités de certains pesticides par un système expérimental levurien, *S. cerevisiae* eucaryote modèle et *M. pulcherrima* de type métabolique opposé, et de confirmer la validité de ce modèle cellulaire dans le contexte de génotoxicité en termes d'adduits à l'ADN.

Nous avons pu identifier la toxicité globale du bénomyl, cyhéxatin et penconazole par la mesure du paramètre IC₅₀ (concentration inhibitrice), ensuite nous avons prouvé la cytotoxicité et la génotoxicité du penconazole par une analyse de la capacité fermentaire et de la croissance cellulaire et la recherche des adduits à l'ADN. Les adduits semblent des biomarqueurs adaptés pour déterminer la génotoxicité du penconazole à des doses résiduelles assez faibles habituellement trouvées dans les denrées ; ces biomarqueurs ont souvent été utilisés dans les études de biosurveillance de l'environnement à des taux de contamination très bas (Yang *et al*, 1996 ; Amat-Bronnert, 2004 ; Mensing *et al*, 2005).

Nous avons ensuite confirmé l'efficacité du système levurien en matière d'adduction à l'ADN en étudiant la réponse génotoxique de notre modèle cellulaire vis-à-vis du B(a)P et de l'AFB₁, deux cancérogènes génotoxiques dont le métabolisme et l'adduction à l'ADN sont entièrement définis.

Ainsi, nous avons mis en évidence une adsorption efficace des molécules de penconazole dans le cas d'exposition au toxique dès l'inoculation, mais il sera intéressant de suivre le devenir des molécules lors de la formation d'adduits pendant la phase de croissance exponentielle, et pendant toutes les phases pour le B(a)P.

Le penconazole est cytotoxique pour des doses allant de 0,2 ppm à 2 ppm, et peut causer des dommages à l'ADN de *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*. Le devenir de ces lésions n'est pas clair, la multiplication cellulaire se déroulant normalement malgré la persistance de ces adduits pendant environ huit cycles de réplication de l'ADN. Par contre, nous n'avons pas vérifié si ces adduits étaient correctement réparés ou bien conduisaient à des mutations non létales. La persistance des

adduits est plus ou moins longue suivant l'adduit et la capacité des organismes à se reproduire. Amat-Bronnert (2004) avait détecté les adduits du B(a)P en grande quantité pendant 48 h dans des cellules hépatiques humaines. L'AFB₁-N⁷-Gua résultant de l'AFB₁ présente un temps de demie vie de 7,5 heures dans les tissus hépatiques de rat avec 20 % de conversion en AFB₁-FAPY pendant les premières 24 heures d'exposition. Dans les tissus hépatiques de truites l'AFB₁-N⁷-Gua est beaucoup plus persistant et présente un temps de demie vie de 21 jours dans les truites maintenus à 12 °C (Wang et Groopman, 1999). La disparition relativement rapide des adduits chez *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* est sans doute due à la capacité importante de réparation des levures (Girard *et al*, 1997, 1998 ; Prakash et Prakash, 2000 ; Kong et Svejstrup, 2002 ; Bedard et Massey, 2006). Une autre explication peut être la détoxification, en effet, il est bien connu que la biotransformation des molécules conditionne leur devenir et leur propriétés biologiques, et certaines molécules au lieu d'être rendues génotoxiques par les enzymes du métabolisme, sont au contraire détoxifiées par ces mêmes enzymes ou par conjugaison (Sutherland, 1992 ; Pfohl-Leszkowicz, 1994a et b ; Guengerich, 2001). La dépollution est un caractère intégrant des levures et le ratio bioactivation/détoxification serait inférieur par rapport à d'autres systèmes cellulaires connus pour activer fortement les xénobiotiques tel que les cellules hépatiques humaines ou animales ; en plus, ce ratio semble directement corrélé au stade métabolique et présente un niveau maximal lors de la phase de croissance exponentielle (Salmon *et al*, 1998). D'ailleurs vu le nombre et la complexité des facteurs impliqués dans la formation et la disparition des adduits, ces biomarqueurs sont souvent utilisés pour refléter une exposition plutôt récente, les adduits pouvant dans certains cas être rapidement éliminés quand l'exposition cesse (Vainio, 2001).

Aucune corrélation ne peut être établie entre la cytotoxicité et la génotoxicité du penconazole. Ceci n'est pas étonnant et, d'ailleurs, la génotoxicité des deux génotoxiques référence n'est pas accompagnée de cytotoxicité. Dans les études de biosurveillance chez les humains, le lien entre les adduits à l'ADN, les mutations et les processus de cancérogenèse est assez clairement établi (Pfohl-Leszkowicz, 1994a et b ; Wang et Groopman, 1999 ; Guengerich, 2001). Chez les levures, Keller-Seitz *et al* (2004) ont confirmé que la conversion enzymatique ou spontanée des adduits de l'aflatoxine B₁ résulte en recombinaisons et mutations, et ils ont étudié les bases moléculaires pour cette recombino-génicité chez *S. cerevisiae* pour aider à comprendre la carcinogénicité de l'aflatoxine B₁. Bedard et Massey (2006) ont montré que l'ADN formé par l'endonucléase lors de la réparation des sites AP résultant de l'aflatoxine B₁ chez les levures, est accessible à une réplication plutôt erronée, augmentant la fréquence des mutations ; leur investigation chez les levures concernant la mutagénicité des adduits induits par l'aflatoxine B₁ et leur capacité à modifier l'activité de réparation contribue à une meilleure compréhension du mécanisme de carcinogénicité de l'aflatoxine B₁ et des mécanismes impliqués dans la réponse à d'autres carcinogènes. Les mutations sont des événements rares en général, suggérant que le TLS mutagène est un phénomène relativement mineur comparé à la majorité des systèmes de réplication correspondant aux voies de tolérance des dommages, qui sont exemptes d'erreur et qui fonctionnent en évitant la lésion et en se servant de la séquence complémentaire intacte pour accomplir la réplication (*damage avoidance*), ces processus ont été démontrés chez *S. cerevisiae* (Baynton *et al*, 1998). Mais tant que la présence des adduits ne sera pas corrélée à une perturbation d'expression phénotypique dans notre modèle expérimental, il sera difficile d'extrapoler sur leur signification. Toutefois, la présence d'un adduit à l'ADN fournit la dose biologique effective de toxique ayant interagit avec les macromolécules cellulaires d'un site cible, elle est plus significative de l'impact de ce toxique qu'une mesure de sa dose interne ou externe. La mesure de ces adduits constitue une estimation du risque des effets potentiels de la pollution environnementale due aux pesticides sur la santé de l'écosystème au niveau de tous ses individus et populations.

D'autre part, les profils d'adduits à l'ADN obtenus chez *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* pour les mêmes toxiques sont différents. De même leur réponse cytotoxique est déclenchée dans des conditions opposées, et les intensités de leurs réponses sont différentes. L'utilisation d'une levure

fermentaire et d'une autre respiratoire pourrait être complémentaire pour évaluer l'incidence cytotoxique et génotoxique des pesticides, chacune de ces deux levures favorisant une voie du métabolisme différente de l'autre.

En résumé, notre étude indique clairement que la détection des adduits à l'ADN dans un système levurien est un outil pertinent pour identifier les risques liés à l'exposition aux pesticides, la validation complète de ce biomarqueur dans les études toxicologiques nécessite l'identification des processus physiologiques et moléculaires menant à la formation des adduits, et la structure chimiques de ces adduits.

Cette étude représente une contribution importante à l'évaluation correcte de l'ampleur du risque sanitaire dû à l'exposition aux résidus de pesticides, et souligne la robustesse du système expérimental levurien comme modèle cellulaire pour la définition des bases cellulaires et moléculaires des toxicités.

Perspectives

L'objectif de cette étude qui visait à identifier la toxicité de certains pesticides, plus particulièrement le penconazole, à l'aide d'un système expérimental levurien et de confirmer ces résultats par un test du modèle cellulaire vis-à-vis de génotoxiques référence a été atteint, et ce sujet mérite plus de recherche

En vue de mieux comprendre le mécanisme de génotoxicité du penconazole, il est maintenant urgent de déterminer son métabolisme, les enzymes impliquées dans la production de métabolites génotoxiques et dans la détoxification, la nature de ces métabolites ainsi que celle des bases modifiées. Il serait également intéressant d'étudier les processus de réparation de l'ADN mises en œuvre chez *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*. Un système *in vitro* formé à partir de protéines levuriennes et de matériel génétique levurien pourra servir pour clarifier ces questions.

D'autre part, une recherche des adduits du penconazole dans un modèle de cellules animales ou humaines exprimant un type déterminé de CYPs ou autres enzymes métaboliques, pourra aider à élucider les mécanismes de cette adduction et sa signification en termes de toxicité humaine.

Il serait aussi indispensable de tester la cytotoxicité et la génotoxicité du penconazole en conditions respiratoires pour les deux levures.

Le penconazole étant appliqué en combinaison avec d'autres molécules et/ou suivant une formulation technique, il sera intéressant de le tester sous ces formes là, les combinaisons de molécules et les formules commerciales pouvant souvent causer plus de dommages aux niveaux cellulaire et moléculaire.

Des expérimentations ultérieures en utilisant des solvants différents pour la migration des adduits dans le but d'obtenir une meilleure résolution de ces adduits pourra faciliter ou améliorer leur caractérisation.

Le but ultime est de pouvoir valider le système 'levurien' comme méthode alternative dans les tests de génotoxicité notamment.

CHAPITRE VI

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abhauer J., 1990. Pesticide residues-Determination and evaluation in food and environment, in Pesticide chemistry, VCH, New York, 361-372
- Ahlers J., Cascorbi I., Forêt M., Gies A., Köhler M., Pauli W., Rösick E., 1991. Interaction with functional membrane proteins – A common mechanism of toxicity for lipophilic environmental chemicals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 1-2, 111-113
- Akiyama Y., Yoshioka N., Ichihashi K., 2005. Study of pesticide residues in agricultural products towards the “positive list” system. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 46, 6, 305-318
- Aksu Z., 2005. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry*, 40, 997-1026
- Albertini S., 1990. Analysis of nine known or suspected spindle poisons for mitotic chromosome malsegregation using *Saccharomyces cerevisiae* D61.M. *Mutagenesis*, 5, 453-459.
- Alberts B. M., Botstein D., Brenner S., Cantor C. R., Doolittle R. F., Hood L., Mckusick V. A., Nathans D., Olson M. V., Orkin S., 1988. Mapping and sequencing the human genome. In National Resource Council, National Academy Press, Washington D. C., 116 p.
- Alvarez P., Sampedro M., Molina M., Nombela C., 1994. A new system for the release of heterologous proteins from yeast based on mutant strains deficient in cell integrity. *Journal of Biotechnology*, 38, 1, 81-88
- Amat-Bronnert A., 2004. Utilisation et validation des adduits a l’ADN comme biomarqueur pour le suivi d’une pollution environnementale - Cas de la marée noire de l’Erika. Thèse de doctorat, INP Toulouse
- Ambrus A., 2004. Reliability of measurements of pesticide residues in food. *Accred. Qual. Assur.*, 9, 288-304
- Anderson W.A.C., Thorpe S.A., Owen L.M., Anderson S.E., Crews H.M., Reynolds S.L., 1998. The analysis of cyhexatin residues in apples, pears and Kiwi fruit using inductivity coupled plasma mass spectrometry as an initial screen for total tin, with confirmation by gas chromatography-mass spectrometry. *Food additives and contaminants*, 15, 3, 288-292
- Arauz L.F., Sutton T.B., Pope L.R., 1990. Simultaneous use of infection criteria for three apple disease for timing of fungicide sprays. *Phytopathology*, 80, 11, 121-218
- Archer T.E., 1973. Removal of dicofol (Kelthane) residues from apple pomace. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 1, 3, 281-288
- Arnaud A., and Guiraud J.-P., 1993. Le métabolisme microbien, in *Biotechnologie*, 4^{ème} édition, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 59-180
- Athanasopoulos P.E., and Pappas C., 2000. Effects of fruit acidity and storage conditions on the rate of degradation of azinphos-méthyl on apples and lemons. *Food chemistry*, 69, 1, 69-72

- Auclair K., Huang H. W., Moëne-Loccoz P., Ortiz de Montellano P. R., 2003. Cloning and expression of a heme binding protein from the genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification*, 28, 340-349
- Aulakh R. S., Gill J. P. S., Bedi J. S., Sharma J. K., Joia B. S., Ockerman H., 2006. Organochlorine pesticide residues in poultry feed, chicken muscle and eggs at a poultry farm in Punjab, India. *Journal of the science of food and agriculture*, 86, 741-744
- Averbeck D. and Averbeck S., 1994. Induction of the genes *RAD54* and *RNR2* by various DNA damaging agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/DNA Repair*, 315, 2, 123-138
- Averbeck D., Polasa K., Buisson J.-P., Bensasson R., Rougée M., Cadet J., Ravanat J.-L., Perin F., Vigny P., Demerseman P., 1993. Photobiological activities of 1,6-dioxapyrene in pro- and eukaryotic cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 287, 2, 165-179
- Ballatori N., and Villalobos A. R., 2002. Defining the Molecular and Cellular Basis of Toxicity Using Comparative Models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 183, 207-220
- Balzan R., Agius D. R., Bannister W. H., 1999. Cloned Prokaryotic Iron Superoxide Dismutase Protects Yeast Cells against Oxidative Stress Depending on Mitochondrial Location. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256, 63-67
- Baril A., Whiteside M., Boutin C., 2005. Analysis of a database of pesticide residues on plants for wildlife risk assessment. *Environmental toxicology and chemistry*, 24, 2, 360-371
- Baynton K., Bresson-Roy A., Fuchs R. P. P., 1998. Analysis of Damage Tolerance Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*: a Requirement for Rev3 DNA Polymerase in Translesion Synthesis. *Molecular and cellular biology*, 18, 2, 960-966
- Beach A.C., and Gupta R.C., 1992. Human biomonitoring and the ³²P-postlabelling assay. *Carcinogenesis*, 13, 1053-1074
- Bedard L. L., and Massey T. E., 2006. Aflatoxin B₁-induced DNA damage and its repair. *Cancer Letters*, article in press
- Belin J. M., 1996. Les levures, in *Microbiologie alimentaire* tome 2, Aliments fermentés et fermentations alimentaires, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 35-52
- Bergauer P., Fonteyne P.-A., Nolard N., Schinner F., Margesin R., 2005. Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere*, 59, 909-918
- Bigger C., Anita H., Ponten I., Page J. E., Dipple A., 2000. Mutational spectra for polycyclic aromatic hydrocarbons in the *supF* target gene. *Mutation Research*, 450, 75-93
- Bizeau C., Le Quere J. M., Michel A., Drilleau J.F., 1992. Possibilité de modéliser la fermentation du cidre. *Cahier scientifique et technique*, 109, 15-21

- Blasco C., Fernandez M., Pico Y., Font G., Manes J., 2002. Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anl. Chim. Acta*, 461, 1, 109-116
- Blasco C., Font G., Manes J., Pico Y., 2005. Screening and evaluation of fruit samples for four pesticide residues. *Journal of AOAC international*, 88, 3, 847-853
- Bligh H. F. J., Wolf C. R., Smith G., Beggs J. D., 1992. Production of cytochrome P450 reductase yeast-rat hybrid proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 110, 1, 33-39
- Bocquet J., 1993. Généralités sur les microorganismes, in *Biotechnologie*, 4^{ème} édition, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 15-58
- Bolognesi C., Peluso M., Degan P., Rabboni R., Munnia A., Abbondandolo A., 1994. Genotoxic effects of the carbamate insecticide, méthomyl. II. In vivo studies with pure compound and the technical formulation, "Lannate 25". *Environmental and molecular mutagenesis*, 24, 235-242
- Bonaly R., 1991. Ultrastructure des levures, in *Biotechnologie des levures*, Masson, Paris, 97-170
- Bonora A., and Mares D., 1982. A simple colorimetric method for detecting cell viability in cultures of eucaryotic microorganisms. *Current Microbiology*, 7, 217-222
- Bonnefoy N., Chalvet F., Hamel P., Slonimski P. P., Dujardin G., 1994. *OXA1*, a *Saccharomyces cerevisiae* Nuclear Gene whose Sequence is Conserved from Prokaryotes to Eukaryotes Controls Cytochrome Oxidase Biogenesis. *Journal of Molecular Biology*, 239, 2, 201-212
- Botton B., 1991. La physiologie des levures, in *Biotechnologie des levures*, Masson, Paris, 97-170
- Bouix M., and Leveau J.-Y., 1993. Les levures, in *Microbiologie industrielle*, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 2-93
- Boumans H., Berden J. A., Grivell L. A., 1995. cDNA sequence of subunit VIII of ubiquinol-cytochrome-c oxidoreductase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1229, 386-388
- Braithwaite E., Wu X., Wang Z., 1999. Repair of DNA lesions: mechanisms and relative repair efficiencies. *Mutation Research*, 424, 207-219
- Breinholt V., Arbogast D., Loveland P., Pereira C., Dashwood R., Hendricks J., Bailey G., 1999. Chlorophyllin Chemoprevention in Trout Initiated by Aflatoxin B1 Bath Treatment: An Evaluation of Reduced Bioavailability vs. Target Organ Protective Mechanisms. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 158, 141-151
- Brooks N., McHugh P. J., Lee M., Hartley J. A., 2000. Alteration in the choice of DNA repair pathway with increasing sequence selective DNA alkylation in the minor groove. *Chemistry & Biology*, 7, 659-668
- Buchenauer H., 1987. Mechanism of action of triazolyl fungicides and related compounds, in *Modern selective fungicides*, Longman scientific & technical, New York, 205-232

- Cabral M.G., Viegas C.A., Teixeira M.C., Sá-Correia I., 2003. Toxicity of chlorinated phenoxyacetic acid herbicides in the experimental eukaryotic model *Saccharomyces cerevisiae*: role of pH and of growth phase and size of the yeast cell population. *Chemosphere*, 51, 47-54
- Cabras, P., Angioni A., Garau V. L., Minelli E. V., Melis M., Pirisi F. M., 1997. Pesticides in the distilled spirits of wine and its by-products. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2248-2251
- Cabras P., Angioni A., Garau V.L., Pirisi F.M., Farris G.A., Madau G., Emonti G., 1999. Pesticides in fermentative processes of wine. *Journal of agriculture and food chemistry*, 47, 3854-3857
- Cabras P., and Angioni A., 2000. Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48, 4, 967-973
- Camougrand N. M., Mouassite M., Velours G. M., Guérin M. G., 2000. The “SUN” Family: *UTH1*, an Ageing Gene, Is Also Involved in the Regulation of Mitochondria Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 375, 1, 154-160
- Cavalieri E.L., and Rogan E.G., 1992. The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacology & Therapeutics*, 55, 183-199.
- Cavalieri E.L., and Rogan E.G., 1998. Role of aromatic hydrocarbons in disclosing how catecholestrogens initiate cancer. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 42, 837-840
- Canova S., Viezzer C., Venier P., Navazio L., Revoltella R., Celotti L., 1996. Metabolic activation of benzo[a]pyrene in two fetal mouse hepatocyte lines: induction of DNA adducts and micronuclei. *Mutation Research*, 367, 135-141
- Cerniglia C. E., 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Advances in applied microbiology*, 30, 31-71
- Cerniglia C. E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Biodegradation*, 3, 351-368
- Charpentier C., 1993. Les arrêts de fermentation : rôle de l'éthanol, résistance de la levure. *Revue française d'œnologie*, 140, 49-52
- Chilver M. J., Harrison J., Webb T. J. B., 1978. Use of immunofluorescence and viability stains in quality control. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 36, 13-18
- Cliff B., Weibel D. E., Lockyer N. P., Jungnickel H., Stephens G., Vickerman J. C., 2003. Detection of chlorinated pesticides on the surface of fungus using ToF-SIMS. *Applied surface science*, 203-204, 710-713
- Cluzeau S., Patunelle M. C., Lhoutellier C., 2000. Index phytosanitaire, Association de coordination technique agricole, ACTA, Paris, 644 p
- Cross J.V., and Berrie A.M., 1994. Effects of repeated foliar sprays of insecticides or fungicides on organophosphate-resistant strains of the orchard predatory mite *Typhlodromus pyri* on apple. *Crop protection*, 13, 1, 39-44

- Cuinier C., 1996. Influence éventuelle des produits phytopharmaceutiques sur les fermentations et la qualité des vins. *Revue française d'œnologie*, 159, 41-43
- Cullin C., 1992. Two distinct sequences control the targeting and anchoring of the mouse P450 1A1 into the yeast endoplasmic reticulum membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184, 3, 1490-1495
- Cupid B.C., Lightfoot T.J., Russell D., Gant S.J., Turner P.C., Dingley K.H., Curtis K.D., Leveson S.H., Turteltaub K.W., Garner R.C., 2004. The formation of AFB₁-macromolecular adducts in rats and humans at dietary levels of exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 559-569
- Cuthbertson A. G. S., and Murchie A. K., 2003. The impact of fungicides to control apple scab (*Venturia inaequalis*) on the predatory mite *Anystis baccarum* and its prey *Aculus schlechtendali* (apple rust mite) in northern Ireland Bramley orchards. *Crop protection*, 22, 1125-1130
- Dallinga, J. W., Pachen, D. M., Wijnhoven, S. W., Breedijk, A., van't Veer, L., Wigbout, G., van Zandwijk, N., Maas, L. M., van Agen, E., Kleinjans, J. C., van Schooten, F. J., 1998. The use of 4-aminobiphenyl haemoglobin adducts and aromatic DNA adducts in lymphocytes of smokers as biomarkers of exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7, 571-577
- Dassa E. P., Dahout-Gonzalez C., Dianoux A. C., Brandolin G., 2005. Functional characterization and purification of a *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier-iso 1 cytochrome *c* fusion protein. *Protein Expression and Purification*, 40, 358-369
- Delia-Dupuy M.L., and Strehaiano P., 1996. La fermentation alcoolique en vinification : observations cinétiques et physiologie. *Revue française d'œnologie*, 159, 19-23
- Derache R., 1986. Toxicologie et sécurité des aliments. Technique et documentation – Lavoisier, Aparaia, Paris, 105-126, 299-321
- Dierickx P. J., 1999. CYP1/2 Activation and Glutathione-dependent Cytotoxicity of Four Pesticides in Hep G2 and Fa32 Cells. *Toxicology in Vitro*, 13, 779-783
- Doignon F., Aigle M., Ribereau-Gayon P., 1993. Resistance to Imidazoles and Triazoles in *Saccharomyces cerevisiae* as a New Dominant Marker. *Plasmid*, 30, 3, 224-233
- Dolinski K., and Botstein D., 2006. Changing perspectives in yeast research nearly a decade after the genome sequence. *Genome research*, 15, 12, 1611-1619
- Drilleau J. F., 1996. La cidrerie, in *Microbiologie alimentaire tome 2, Aliments fermentés et fermentations alimentaires*, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 137-149
- Dubernet M., Fortune G., Simon F., 1990. Enquête : produits de traitement de la vigne et accidents de fermentation. *Revue française d'œnologie*, 30, 123, 35-43
- Dubois M., Pfohl-Leskowicz A., Grosse Y., Kremers P., 1995. DNA adducts and P450 induction in human, rat and avian liver cells after exposure to polychlorobiphenyls. *Mutation Research*, 345, 181-190

- Dubois M., Pfohl-Leszkowicz A., De Waziers I., Kremers P., 1996. Selective induction of the CYP3A family by endosulfan and DNA-adduct formation in different hepatic and hepatoma cells. *Environmental toxicology and pharmacology*, 1, 249-256
- Dubois M., Grosse Y., Thomé J. P., Kremers P., Pfohl-Leszkowicz A., 1997. Metabolic activation and DNA adducts detection as biomarkers of chlorinated pesticide exposures. *Biomarkers*, 2, 17-24
- Dueñas M., Irastorza A., Fernandez K., Bilbao A., Huerta A., 1994. Microbial populations and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods. *Journal of food sciences*, 59, 5, 1060-1064
- Edder P., Ortellì D., Corvi C., 2004. Survey of pesticide residues in pomes fruits and tomatoes from local and foreign productions. *Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène*, 95, 437-446
- Endo-Ichikawa Y., Kohno H., Tokunaga R., Taketani S., 1995. Induction in the gene RNR3 in *Saccharomyces cerevisiae* upon exposure to different agents related to carcinogenesis. *Biochemical Pharmacology*, 50, 10, 1695-1699
- Eugster H.-P., Bärtsch S., Würigler F. E., Sengstag C., 1992. Functional co-expression of human oxidoreductase and cytochrome P450 1A1 in *Saccharomyces cerevisiae* results in increased erod activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 185, 2, 641-647
- FAO/OMS Commission du Codex Alimentarius, 1994. Résidus de pesticides dans les denrées alimentaires, 2, FAO/OMS, Rome 477p.
- FAO/OMS Commission du Codex Alimentarius, 2004. Disponible sur <http://apps.fao.org>
- Fang j., and Beattie D., 2003. External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxyde. *Free Radical Biology & Medicine*, 34, 4, 478-488
- Fasullo M., Dave P., Rothstein R., 1994. DNA-damaging agents stimulate the formation of directed reciprocal translocations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.*, 314, 2, 121-133
- Faucet-Marquis V., 2005. L'ochratoxine A, contaminant alimentaire, est-elle un cancérigène génotoxique ou épigénétique? Recherche des effets génotoxiques par la technique de postmarquage de l'ADN au ³²P en relation avec la métabolisation de l'ochratoxine A. Thèse de doctorat, INP Toulouse
- Ferguson L. R., 1990. Mutagenic and recombinogenic consequences of DNA-repair inhibition during treatment with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation research*, 241, 4, 369-377
- Fickers P., Benetti P. H., Wache Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M. S., Nicaud J. M., 2005. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS yeast research*, 5, no 6-7, 527-543
- Field J. A., Boelsma F., Baten H., Rulkens W. H., 1995. Oxidation of anthracene in water/solvent mixtures by the white-rot fungus, *Bjerkandera* sp. Strain BOS55. *Applied microbiology and biotechnology*, 44, 1-2, 234-240

- Fishbein L., 1977. Toxicological aspects of fungicides, in Antifungal compounds, vol. 2, Marcel Dekker, New York, 537-598
- Fitzell R. D., and Peak C. M., 1992. Field evaluation of benomyl to control cylindrocladium fruit spot of custard apple. Australian plant pathology, 21, 1, 16-17
- Fitzgerald D. J., Dryden G. L., Bronson E. C., Williams J. S., Anderson J. N., 1995. Conserved patterns of bending in satellite and nucleosome positioning DNA. J. Biol. Chem. 269, 21303-21314
- Forman S., Novák J., Tykva R., Káš J., Wimmer Z., Ruml T., 2002. Evaluation of toxicity of pesticides and their biodegradation products using human cells. Chemosphere, 46, 209-217
- Freire-Picos M. A., Hollenberg C. R., Breunig K. D., Cerdan M. E., 1995. Regulation of cytochrome c expression in the aerobic respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. FEBS Letters, 360, 39-42
- Fujita K., Nagaoka M., Komatsu Y., Iwahashia H., 2003. Yeast pheromone signaling pathway as a bioassay to assess the effect of chemicals on mammalian peptide hormones. Ecotoxicology and Environmental Safety, 56, 358-366
- Fussell R. J., Jackson A. K., Reynolds S. L., Wilson M. F., 2002. Assessment of the stability of pesticides during cryogenic sample processing. 1. Apples. Journal of agricultural and food chemistry, 50, 441-448
- Gallagher E. P., Kunze K. L., Stapleton P. L., Eaton D., 1996. The Kinetics of Aflatoxin B1 Oxidation by Human cDNA-Expressed and Human Liver Microsomal Cytochromes P450 1A2 and 3A4. Toxicology and applied pharmacology, 141, 595-606
- Galzy P., 1993. Le génie génétique, in Biotechnologie, 4^{ème} édition, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 451-538
- Garner R. C., 1998. The role of DNA adducts in chemical carcinogenesis. Mutation Research, 402, 67-75
- Geahchan A., Abi Zeid Daou A., 1995. Répertoire des produits phytosanitaires, Beyrouth, Liban, 244 p.
- Girard P. M., Guibourt N., Boiteux S., 1997. The Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: a 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase/AP lyase whose lysine 241 is a critical residue for catalytic activity. Nucleic Acids Research, 25, 16, 3204-3211
- Girard P. M., D'Ham C., Cadet J., Boiteux S., 1998. Opposite base-dependant excision of 7,8-dihydro-8-oxoadenine by the Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. Carcinogenesis, 19, 7, 1299-1305
- Goffeau, A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., and Oliver S. G., 1996. Life with 6000 genes. Science, 274, 546, 563-567

- Goin C. J., and Mayer V. W., 1995. Induction of chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae* strain D61.M by selected benzimidazole compounds. *Mutation Research*, 343, 185-199
- Gomes D. S., Riger C. J., Pinto M. L. C., Panek A. D., Eleutherio E. C. A., 2005. Evaluation of the role of Ace1 and Yap1 in cadmium absorption using the eukaryotic cell model *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20, 3, 383-389
- Guengerich F. P., Gillam E. M. J., Ohmori S., Sandhu P., Brian W. R., Sari M. A., Iwasaki M., 1993. Expression of human cytochrome P450 enzymes in yeast and bacteria and relevance to studies on catalytic activities. *Toxicology*, 82, 21-37.
- Guengerich F. P., 2001. Reflections in *Mutation Research*, Forging the links between metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research*, 488, 195-209
- Guo D., Xie Z., Shen H., Zhao B., Wang Z., 2004. Translesion synthesis of acetylaminofluorene-dG adducts by DNA polymerase ζ is stimulated by yeast Rev1 protein. *Nucleic Acids Research*, 32, 3, 1122-1130
- Guo Y., Breeden L., Zarbl H., Preston B. D., and Eaton D., 2005. Expression of a human cytochrome P450 in yeast permits analysis of pathways for response to and repair of aflatoxin-induced DNA damage. *Molecular and cellular biology*, 25, 14, 5823-5833
- Guo Y., Breeden L. L., Fan W., Zhao P. L., Eaton D. L., Zarbl H., 2006. Analysis of cellular responses to aflatoxin B1 in yeast expressing human cytochrome P450 1A2 using cDNA microarrays. *Mutation Research*, 593, 121-142
- Gupta R. C., Reddy M. V., Randerath K., 1982. ^{32}P -postlabelling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis*, 3, 1081-1092.
- Hartwig A., and Schwerdtle T., 2002. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicology Letters*, 127, 47-54
- Hargreaves J. A., Keon J. P. R., Croxen R., 1996. Molecular genetics of ergosterol biosynthesis in *Ustilago maydis*, in *Modern fungicides and antifungal compounds*, Intercept, U.K., 117-125
- Hedli C. C., Snyder R., Kinoshita F. K., Steinberg M., 1998. Investigation of hepatic cytochrome P-450 enzyme induction and DNA adduct formation in male CD/1 mice following oral administration of Toxaphene. *Journal of applied toxicology*, 18, 173-178
- Heard G., 1999. Novel yeasts in winemaking - looking to the future. *Food Australia*, 51, 8, 347-352
- Hemminki K., 1995. DNA adducts in biomonitoring. *Toxicology Letters*, 77, 227-229
- Hickey D. R., Jayaraman K., Goodhue C. T., Shah J., Fingar S. A., Clements J. M., Hosokawa Y., Tsunasawa S., Sherman F., 1991. Synthesis and expression of genes encoding tuna, pigeon, and horse cytochromes *c* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 105, 1, 73-81
- Hiraga K., Yamamoto S., Fukuda H., Hamanaka N., Oda K., 2005. Enniatin has a new function as an inhibitor of Pdr5p, one of the ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328, 1119-1125

- Hurst M. R., and Sheahan D. A., 2003. The potential for oestrogenic effects of pesticides in headwater streams in the UK. *The Science of the Total Environment*, 301, 87-96
- Hwang G. W., Furuoya Y., Hiroshima A., Furuchi T., Naganuma A., 2005. Overexpression of Bop3 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* through interaction with other proteins such as Fkh1, Rts1, and Msn2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330, 378-385
- Janisiewicz W. J., Tworowski T. J., Kurtzman C. P., 2001. Biocontrol potential of *Metschnikowia pulcherrima* Strains against blue mold of apple. *Phytopathology*, 91, 11, 1098-1108
- Jackson R. S., 1994. *Wine science, principles and applications*, Academic press, San Diego, California, 235-276
- Jeannot R., Sabik H., Sauvard E., Genin E., 2000. Application of liquid chromatography with mass spectrometry combined with photodiode array detection and tandem mass spectrometry for monitoring pesticides in surface waters. *Journal of chromatography A*, 879, 51-71
- Jeffrey A. M., and Williams G. M., 2005. Risk assessment of DNA-reactive carcinogens in food. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207, S628-S635
- Jones R. P., 1987. Measures of yeast death and desactivation and their meaning. *Process biochemistry*, 22, 118-134
- Jones A. L., and Ehret G. R., 1993. Potential for zero residue disease control programs for fresh and processed apples using sulfur, fenarimol and myclobutanil. *Plant disease*, 77, 11, 1114-1118
- Juhasz A. L., and Naidu R., 2001. Extraction and recovery of organochlorine pesticides from fungal mycelia. *Journal of microbiology methods*, 39, 149-158
- Kalb V. F., Loper J. C., Dey C. R., Woods C. W., Sutter T. R., 1986. Isolation of a cytochrome P450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 45, 237-245
- Kaszycki P., Fedorovych D., Ksheminska H., Babyak L., Wójcik D., Koloczek H., 2004. Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions. *Microbiological Research*, 159, 11-17
- Kawanishi M., Sakamoto M., Ito A., Kishi K., Yagi T., 2003. Construction of reporter yeasts for mouse aryl hydrocarbon receptor ligand activity. *Mutation Research*, 540, 99-105
- Keller-Seitz M. U., Certa U., Sengstag C., Wurgler F. E., Sun M., Fasullo M., 2004. Transcriptional response of yeast to aflatoxin B1: recombinational repair involving *RAD51* and *RAD1*. *Molecular biology of the cell*, 15, 4321-4336
- Khan A. A., Wang R. F., Cao W. W., Doerge D. R., Wennerstrom D., Cerniglia C. E., 2001. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. *Applied and environmental microbiology*, 67, 8, 3577-3585

- Kiakos K., Howard T. T., Lee M., Hartley J. A., McHugh P. J., 2002. *Saccharomyces cerevisiae* RAD5 Influences the Excision Repair of DNA Minor Groove Adducts. The journal of biological chemistry, 277, 46, 44576-44581
- Kim S. J., Kweon O., Freeman J. P., Jones R. C., Adjei M. C., Jhoo J. W., Edmondson R. D., Cerniglia C. E., 2006. Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* Pyr-1. Appl. Environ. Microbiol., 72, 2, 1045-1054
- Kim Y. H., Ahn J. Y., Moon S. H., Lee J., 2005. Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, malathion by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi cutinase. Chemosphere, 60, 10, 1349 - 1355
- King D. J., and Wiseman A., 1987. Yeast cytochrome P-448 enzymes and the activation of mutagens, including carcinogens. In: Enzyme induction, mutagen activation and carcinogen testing in yeast (Wiseman, A., ed.), 115-167, Ellis Horwood, Chichester
- King D. J., Azari M. R., Wiseman A., 1984. Studies on the properties of highly purified cytochrome P-448 and its dependant activity benzo(a)pyrene, hydroxylase, from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 105, 1115-1121
- Kong S. E., and Svejstrup J. Q., 2002. Incision of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct by nucleotide excision repair proteins from yeast. DNA Repair, 1, 731-741
- Kozack R., Seo K. Y., Jelinsky S. A., Loechler E. L., 2000. Toward an understanding of the role of DNA adduct conformation in defining mutagenic mechanism based on studies of the major adduct (formed at N² -dG) of the potent environmental carcinogen, benzo[a]pyrene. Mutation Research, 450, 41-59
- Kreger-van Rij N.J.W., 1984. The yeasts, a taxonomic study, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam
- Kriek E., Rojas M., Alexandrov K., Bartsch H., 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk. Mutation Research, 400, 215-231
- Krogh P. H., 1995. Does a heterogeneous distribution of food or pesticide affect the outcome of toxicity tests with Collembola?. Ecotoxicology and environmental safety, 30, 158-163
- La D. K., and Swenberg J. A., 1996. DNA adducts: biological markers of exposure and potential applications to risk assessment. Mutation Research, 365, 129-146
- Lacour T., and Dumas B., 1996. A gene encoding a yeast equivalent of mammalian NADPH-adrenodoxin oxidoreductases. Gene, 174, 289-292
- Lagueux J., Pereg D., Ayotte P., Dewailly E., Poirier G. G., 1999. Cytochrome P450 CYP1A1 Enzyme Activity and DNA Adducts in Placenta of Women Environmentally Exposed to Organochlorines. Environmental Research Section A, 80, 369-382

- Lal S., and Lal R., 1987. Bioaccumulation, metabolism and effects of DDT, fenitrothion and chlorpyrifos on *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of environmental contamination and toxicology, 16, 753-757
- Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., Fitzhugh W., *et al*, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 409, 860-921
- Lange H., Bavouzet J. M., Taillandier P., Delorme C., 1993. Systematic error and comparison of four methods for assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspension. Biothechnology Techniques, 7, 223-228
- Laouedj A., Schenk C., Pfohl-Leszkowicz A., Keith G., Schontz D., Guillemaut P., Rether B., 1995. Detection of DNA adducts in declining hop plants grown on fields formerly treated with heptachlor, a persistent insecticide. Environmental Pollution, 90, 3, 409-414
- Launen L. A., Pinto L. J., Moore M. M., 1999. Optimisation of pyrene oxidation by *penicillium janthinellum* using response-surface methodology. Applied microbiology and biotechnology, 51, 4, 510-515
- Lee J. S., Huh W. K., Lee B. H., Baek Y. U., Hwang C. S., Kim S. T., Kim Y. R., Kang S. O., 2001. Mitochondrial NADH-cytochrome b5 reductase plays a crucial role in the reduction of D-erythroascorbyl free radical in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica et Biophysica Acta, 1527, 31-38
- Leveau J. Y., and Bouix M., 1993. Cinétiques microbiennes, in Biotechnologie, 4^{ème} édition, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 118-209
- Levine S. L., and Oris J. T., 1999. Enhancement of Acute Parathion Toxicity to Fathead Minnows Following Pre-exposure to Propiconazole. Pesticide biochemistry and Physiology, 65, 102-109
- Lin P. H., Nakamura J., Yamaguchi S., Upton P. B., La D. K., Swenberg J. A., 2001. Oxidative damage and direct adducts in calf thymus DNA induced by the pentachlorophenol metabolites, tetrachlorohydroquinone and tetrachloro-1,4-benzoquinone. Carcinogenesis, 22, 4, 627-634
- Lin P. H., La D. K., Upton P. B., Swenberg J. A., 2002. Analysis of DNA adducts in rats exposed to pentachlorophenol. Carcinogenesis, 23, 2, 365-369
- Liu M., Grant S. G., Macina O. T., Klopman G., Rosenkranz H. S., 1997. Structural and mechanistic bases for the induction of mitotic chromosomal loss and duplication 'malsegregation' in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Relevance to human carcinogenesis and developmental toxicology. Mutation Research, 374, 209-231
- Lodovici M., Casalini C., Briani C., Dolara P., 1997. Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. Toxicology, 117, 55-60
- Loureiro S., Soares A. M. V. M., Nogueira A. J. A., 2005. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. Environmental Pollution, 138, 1, 121 - 131

- Lubbers S., Charpentier C., Feuillat M., Voilley A., 1994. Influence of yeast walls on the behavior of aroma compounds in a model wine. *American journal of enology and viticulture*, 45, 1, 29-33
- Lucau-Danila A., Lelandais G., Kozovska Z., Tanty V., Delaveau T., Devaux F., Jacq C., 2005. Early expression of yeast genes affected by chemical stress. *Mol Cell Biol*, 25, 5, 1860-1868.
- Ma J., 2005. Differential sensitivity of three cyanobacterial and five green algal species to organotins and pyrethroids pesticides. *Science of the Total Environment*, 341, 109-117
- Mafart P., 1986. Influence de la flore de fermentation sur la flaveur des cidres et sélection des souches, *Technique appliquée*, 17, 4, 33-37
- Magdolen V., Oechsner U., Trommler P., Bandlow W., 1990. Transcriptional control by galactose of a yeast gene encoding a protein homologous to mammalian aldo/keto reductases. *Gene*, 90, 1, 105-114
- Maiorano D., Cece R., Badaracco G., 1997. Satellite DNA from the brine shrimp *Artemia* affects the expression of a flanking gene in yeast. *Gene*, 189, 13-18
- Marinovich M., Ghilardi F., Galli C. L., 1996. Effect of pesticide mixtures on in vitro nervous cells: Comparison with single pesticides. *Toxicology*, 108, 201-206
- Martin F. L., Pearce T. G., Hewer A., Phillips D. H., Semple K. T., 2005. A biomarker model of sublethal genotoxicity (DNA single-strand breaks and adducts) using the sentinel organism *Aporrectodea longa* in spiked soil. *Environmental Pollution*, 138, 307-315
- Martinez P., Valcarcel M. J., Pérez L., Benitez T., 1998. Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* flor yeasts during fermentation and biological aging of fino sherry: by-products and aroma compounds. *American Journal of enology and viticulture*, 49, 3, 240-250
- Masia A., Avery S. V., Zoroddu M. A., Gadd G. M., 1998. Enrichment with a polyunsaturated fatty acid enhances the survival of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of tributyltin. *FEMS Microbiology Letters*, 167, 321-326
- Mattison D. R., Wohlleb J., To T., Lamb Y., Faitak S., Brewster M. A., Walls R. C., Selevan S. G., 1992. Pesticide concentrations in Arkansas breast milk. *J. Ark. Med. Soc.*, 88, 11, 553-557
- McA'Nulty M. M., and Lippard S. J., 1996. The HMG-domain protein Ixrl blocks excision repair of cisplatin-DNA adducts in yeast. *Mutation Research*, 362, 75-86
- McCarroll N. E., Protzel A., Ioannou Y., Stack H. F., Jackson M. A., Waters M. D., Dearfield K. L., 2002. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. *Mutation Research*, 512, 1-35
- Mensing T., Marczynski B., Engelhardt B., Wilhelm M., Preuss R., Kappler M., Angerer J., Käßlerlein H. U., Scherenberg M., Seidel A., Brüning T., 2005. DNA adduct formation of benzo[a]pyrene in white blood cells of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. J. Hyg. Environ.-Health*, 208, 173-178

- Mezieres, Rey, Carbonnel M., 1988. Les résidus des produits de traitements dans la vendange et leur influence sur la vinification. *Revue française de l'œnologie*, 8, 114, 19-22
- Michel A., Bizeau C., Drilleau J. F., 1990. Relations métaboliques entre levures impliquées dans la fermentation du cidre. *Belgian journal of food chemistry and biotechnology*, 45, 3, 98-104
- Millán S., Sampedro M. C., Unceta N., Goicolea M. A., Rodriguez E., Barrio R. J., 2003. Coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for direct and sensitive determination of halogenated fungicides in wine. *Journal of chromatography A*, 995, 135-142
- Moline H. E., and Locke J. C., 1993. Comparing Neem Seed oil with calcium chloride and fungicides for controlling post harvest apple decay. *Hort Science*, 28, 7, 719-720
- Monteil H., Blazy-Maugem F., Michel G., 1986. Influence des pesticides sur la croissance des levures des raisins et des vins. *Sciences des aliments*, 3, 30, 349-360
- Morace G., Sanguinetti M., Posteraro B., Lo Cascio G., Fadda G., 1997. Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol*, 35, 667-672
- Munnia A., Puntoni R., Merlo F., Parodi S., Peluso M., 1999. Exposure to Agrochemicals and DNA Adducts in Western Liguria, Italy. *Environmental and molecular mutagenesis*, 34, 52-56
- Murray B. P., and Correia M. A., 2001. Ubiquitin-D ependent 26S Proteasomal Pathway: A Role in the Degradation of Native Human Liver CYP3A4 Expressed in *Saccharomyces Cerevisiae*?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 393, 1, 106-116
- National Research Council, 1993. Pesticides in the diets of infants and children, National academy press, Washington D.C., 386 p.
- Navarro S., Oliva J., Barba A., Navarro G., Garcia M. A., Zamorano M., 2000. Evolution of Chlorpyrifos, Fenarimol, Metalaxyl, Penconazole, and Vinclozolin in red wines elaborated by carbonic maceration of Monastrell grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3537-3541
- Navarro S., Barba A., Oliva J., Navarro G., Pardo F., 1999. Evolution of residual levels of six pesticides during elaboration of red wines. Effect of wine-making procedures in their disappearance. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 264-270
- Nelson G. B., and Ross J. A., 1998. DNA adduct formation by the pesticide Alachlor and its metabolite 2-chloro-N-(2,6-diethylphenyl)acetamide (CDEPA), 1998. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 60, 387-394
- Nguyen H.V., and Panon G., 1998. The yeast *Metschnikowia pulcherrima* has an inhibitory effect against various yeast species. *Sciences des aliments*, 18, 515-526
- Nishimura K., Yamamoto M., Nakagoni T., Takiguchi Y., Naganuma T., Usuka Y., 2001. Biodegradation of triazine herbicides on polyvinylalcohol gel plates by the soil yeast *Lipomyces starkeyi*. *Applied microbiology and biotechnology*, 58, 6, 848-852

- Novák J., Vlasáková V., Tykva R., Ruml T., 2003. Degradation of juvenile hormone analog by soil microbial isolates. *Chemosphere*, 52, 151-159
- Ohashi K., Kajiya K., Inaba S., Hasegawa T., Seko Y., Furuchi T., Naganuma A., 2003. Copper (II) protects yeast against the toxicity of cisplatin independently of the induction of metallothionein and the inhibition of platinum uptake. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310, 148-152
- Ohgiya S., Goda T., Hoshino T., Kamataki T., Ishizaki K., 1997. Establishment of a Novel Host, High-Red Yeast That Stably Expresses Hamster NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase: Usefulness for Examination of the Function of Mammalian Cytochrome P450. *Archives of biochemistry and Biophysics*, 343, 2, 215-224
- Oliva J., Navarro S., Barba A., Navarro G., 1999. Determination of chlorpyrifos, penconazole, fenarimol, vinclozolin and metalaxyl in grapes, must and wine by on-line microextraction and gas chromatography. *Journal of chromatography A*, 833, 43-51
- OMS, 1984. Environmental health criteria 38, Heptachlor. Genève : Organisation Mondiale de la Santé, 81 p.
- Ortelli D., Edder P., Corvi C., 2005. Pesticide residues survey in citrus fruits. *Food additives and contaminants*, 22, 5, 423-428
- Pan H. J., and Ho W. H., 2004. Determination of fungicides in water using liquid phase microextraction and gaz chromatography with electron capture detection. *Analytica chimica Acta*, 527, 61-67
- Panon G., 1997. Cultures mixtes et séquentielles de levures cidricoles : *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*, *Hanseniaspora valbyensis* et *Metschnikowia pulcherrima*. Rôle de l'oxygène et suivi des paramètres de fermentation en milieu modèle. *Sciences des aliments*, 17, 193-217
- Paret C., Ostermann K., Krause-Buchholz U., Rentzsch A., Roedel G., 1999. Human members of the SCO1 gene family: complementation analysis in yeast and intracellular localization. *FEBS Letters*, 447, 65-70
- Parlat S. S., Özcan M., Oguz H., 2001. Biological suppression of aflatoxicosis in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) by dietary addition of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Research in Veterinary Science*, 71, 207-211
- Parry J. M., 1999. Use of tests in yeasts and fungi in the detection and evaluation of carcinogens. *IARC Sci. Publ.*, 146, 471-485
- Pelkonen P., Lang M. A., Wild C. P., Negishi M., Juvonen R. O., 1994. Activation of aflatoxin B₁ by mouse CYP2A enzymes and cytotoxicity in recombinant yeast cells. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology*, 292, 1, 67-73
- Peluso M., Bolognesi C., Munia A., Landini E., Parodi S., 1998. In Vivo Studies on Genotoxicity of a Soil Fumigant, Dazomet. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32, 179-184

- Pereg D., Robertson L. W., Gupta R. C., 2002. DNA adduction by polychlorinated biphenyls: adducts derived from hepatic microsomal activation and from synthetic metabolites. *Chemico-Biological Interactions*, 139, 129-144
- Perera F. P., Rauh V., Whyatt R. M., Tang D., Tsai W. Y., Bernert J. T., Tu Y. H., Andrews H., Barr D. B., Camann D. E., Diaz D., Dietrich J., Reyes A., Kinney P. L., 2005. A Summary of Recent Findings on Birth Outcomes and Developmental Effects of Prenatal ETS, PAH, and Pesticide Exposures. *NeuroToxicology*, 26, 573-587
- Pfohl-Leszkowicz A., 1994a. Détection des adduits à l'ADN comme biomarqueurs d'exposition aux cancérigènes de l'environnement. *Analisis magazine*, 22, 1, 12-15
- Pfohl-Leszkowicz A., 1994b. Effet des cancérigènes sur la méthylation biologique de l'ADN et détection des adduits a l'ADN. *Regard sur la biochimie*, 3, 51-61
- Pfohl-Leszkowicz A., Chakor K., Creppy EE., Dirheimer G., 1991. DNA-adducts formation and variation of DNA-methylation after treatment of mice with ochratoxin A., in: *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tracts Tumours* (M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky, H. Bartsch, eds) IARC Scientific Public. Lyon, 115, 245-253
- Pfohl-Leszkowicz A., Grosse Y., Kane A., Creppy EE., Dirheimer G., 1993. Differential DNA-adduct formation and disappearance in three mice tissues after treatment by the mycotoxin, ochratoxin A. *Mutation Research*, 289, 265-273
- Phillips D. H., 1997. Detection of DNA modifications by the ³²P- postlabelling assay. *Mutation Res.*, 378, 1-12
- Phillips D. H., and Castegnaro M., 1993. Results of an interlaboratory trial of ³²P-postlabelling, in: D.H. Phillips, M. Castegnaro, H. Bartsch (Eds.), *Postlabelling Methods for Detection of DNA Adducts*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, IARC Sci. Publ., 124, 35-49
- Phillips D. H., and Castegnaro M., 1999. Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis*, 14, 301-315
- Picó Y., Font G., Mañes J., 2004. in *Handbook of food analysis*, 2nd Ed., L. M. L. Nollet (Ed.), Marcel Dekker, New York, NY, 1072 p.
- Pilone G.J., 1986. Effect of triadimenol fungicide on yeast fermentations. *American Journal of enology and viticulture*, 37, 4, 304-306
- Pogačnik L., and Franko M., 1999. Determination of organophosphate and carbamate pesticides in spiked samples of tap water and fruit juices by a biosensor with photothermal detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 14, 6, 569-578
- Poli P., De Mello M. A., Buschini A., Mortara R. A., De Albuquerque C. N., Da Silva S., Rossi C., Zucchi T. M. A. D., 2002. Cytotoxic and genotoxic effects of megalol, an anti-Chagas' disease drug, assessed by different short-term tests. *Biochemical Pharmacology*, 64, 1617-1627

- Postgate J. P., 1967. Viability measurements and the survival of microbes under minimum stress. *Advances in Microbiology and physiology*, 1, 1-23
- Prakash S., and Prakash L., 2000. Nucleotide excision repair in yeast. *Mutation research*, 451, 13-24
- Randerath K., Reddy M. V., Gupta, R. C., (1981). ³²P-labeling test for DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 6126-6129
- Randerath K., and Randerath E., 1994. ³²P-postlabelling methods for DNA adduct detection: overview and critical evaluation. *Drug Metab. Rev.*, 26, 67-85.
- Rakitsky V. N., Koblyakov V. A., Turusov V. S., 2000. Nongenotoxic (Epigenetic) Carcinogens: Pesticides as an Example. A Critical Review. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 20, 229-240
- Reddy M.V., and Randerath K., 1986. Nuclease P1 mediated enhancement sensitivity of ³²P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis*, 7, 1543-1551
- Reyes J. G. G., Leyva N. R., Millan O. A., Lazcano G. A., 2002. Effects of Pesticides on DNA and Protein of Shrimp Larvae *Litopenaeus stylirostris* of the California Gulf. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53, 191-195
- Ribeirio I. C., Verissimo I., Moniz L., Cardoso H., Sousa M. J., Soares A. M. V. M., Leão C., 2000. Yeasts as a model for assessing the toxicity of the fungicides penconazole, cymoxanil and dichlofluanid. *Chemosphere*, 41, 10, 1637-1642
- Rodriguez C. E., Shinyashiki M., Froines J., Chun Yu R., Fukuto J. M., Cho A. K., 2004. An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Toxicology*, 201, 185-196
- Rubin G. M., Yandell M. D., Wortmann J. R., Gabor Miklos G. L., Nelson C. R., Hariharan I. K., Fortini M. E., Li P. W., Apweiler R., Fleischmann W., *et al*, 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, 287, 2204-2215
- Rueeg J., and Siegfried W., 1996. Residues of difenoconazole and penconazole on apple leaves and grass and soil in an apple orchard in north-eastern Switzerland. *Crop protection*, 15, 1, 27-31
- Sablayrolles J.M., Salmon J.M., Barre P., 1996. Carences nutritionnelles des moûts. Efficacité des ajouts combinés d'oxygène et d'azote ammoniacal. *Revue française d'œnologie*, 159, 25-32
- Šajbidor J., Breierova E., Lamačka M., Bohov P., 1999. Influence of methylfenpropidine on growth, sterol content and fatty acid composition of *Candida albicans*. *Folia Microbiologica*, 45, 4, 313-319
- Salmon J. M., Fornairon C., Barre P., 1998. Determination of Oxygen Utilization Pathways in an Industrial Strain of *Saccharomyces cerevisiae* during Enological Fermentation. *Journal of fermentation and bioengineering*, 86, 2, 154-163

- Sanderson J. T., Boerma J., Lansbergen G. W. A., van den Berg M., 2002. Induction and Inhibition of Aromatase (CYP19) Activity by Various Classes of Pesticides in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 182, 44-54
- Sancar A., and Tang M. S., 1993. Nucleotide excision repair. *Photochemistry and photobiology*, 57, 5, 905-921
- Schägger H., 2002. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1555, 154-159
- Schäfer B., 2005. RNA maturation in mitochondria of *S. cerevisiae* and *S. pombe*. *Gene*, 354, 80-85
- Seaton B. L., and Vickery L. E., 1992. Expression of human ferredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*: Mitochondrial import of the protein and assembly of the [2Fe-2S] center. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 294, 2, 603-608
- Seghezzi W., Sanglard D., Fiechter A., 1991. Characterization of a second alkane-inducible cytochrome P450-encoding gene, *CYP52A2*, from *Candida tropicalis*. *Gene*, 106, 1, 51-60
- Sengstag C., Weibel B., Fasullo M., 1997. High recombinogenicity of aflatoxin in yeast may indicate a mechanism for genetic changes in aflatoxin-induced hepatocarcinomas. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 379, 1, S58
- Seo K. Y., Jelinsky S. A., Loechler E. L., 2000. Factors that influence the mutagenic patterns of DNA adducts from chemical carcinogens. *Mutation Research*, 463, 215-246
- Shah R. G., Lagueux J., Kapur S., Levallois P., Ayotte P., Tremblay M., Zee J., Poirier G. G., 1997. Determination of genotoxicity of the metabolites of the pesticides Guthion, Sencor, Lorox, Reglone, Daconil and Admire by ³²P-Postlabeling. *Molecular and cellular Biochemistry*, 169, 177-184
- Sharma I. D., Patyal S. K., Nath A., Joshi V. K., 2001. Effect of processing on mancozeb residues in apple. *Journal of food science and technology*, 38, 1, 23-25
- Schilderman P. A. E. L., Moonen E. J. C., Maas L. M., Welle I., Kleijnans J. C. S., 1999. Use of Crayfish in Biomonitoring Studies of Environmental Pollution of the River Meuse. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44, 241-252
- Shuker D. E. G., 2002. The enemy at the gates? DNA adducts as biomarkers of exposure to exogenous and endogenous genotoxic agents. *Toxicology Letters*, 134, 51-56
- Sinigaglia M., Corbo M. R., Caccarone C., 1998. Influence of temperature, pH and water activity on "in vitro" inhibition of *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling by yeasts *Microbiological research*, 153, 2, 137-143
- Skaggs B. A., Alexander J. F., Pierson C. A., Schweitzer K. S., Chun K. T., Koegel C., Barbuch R., Bard M., 1996. Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P450 involved in ergosterol biosynthesis. *Gene*, 169, 105-109

- Sohn H. Y., Kwon C. S., Kwon G. S., Lee J. B., Kim E., 2004. Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan-induced oxidative damage. *Toxicology Letters*, 151, 357-365
- Spadaro D., Vola R., Piano S., Gullino M.L., 2001. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest biology and technology*, 24, 2, 123-134
- Spittler T. D., Argauer R. J., Lisk D. J., Mumma R. O., Winnett G., 1982. Gas-liquid chromatographic determination of fenvalerate insecticide residues in processed apple products and by-products. *Journal of AOAC*, 65, 5, 1106-1111
- Stanley V. G., Ojo R., Woldensenbet S., Hutchinson D. H., 1993. The use of *Saccharomyces cerevisiae*, to suppress the effect of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science*, 72, 1867-1872
- Steffen K. T., Hatakka A., Hofrichter M., 2003. Degradation of benzo(a)pyrene by the litter-decomposing basidiomycete *Stropharia coronilla*: role of manganese peroxidase. *Applied and environmental microbiology*, 69, 7, 3957 - 3964
- Strehaiano P., 1984. Phénomènes d'inhibition en fermentation alcoolique: observations cinétiques. Thèse d'état, INP Toulouse
- Sun X. H., Song J. R., Tan Z. C., Di Y. Y., Ma H. X., Wang M. H., Sun L. X., 2004. Heat capacity and enthalpy of fusion of penconazole (C₁₃H₁₅C₁₂N₃). Short communication, *Thermochimica Acta*, 413, 261-265
- Sutherland J. B., 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *Journal of industrial microbiology*, 9, 53-62
- Suwalsky M., Benites M., Norris B., Sotomayor P., 2000. Toxic effects of the fungicide benomyl on cell membranes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 125, 111-119
- Swait A. A. J., and Butt D. J., 1990. Fungicides as antisporeulant against apple powdery mildew and scab. *Annals of applied biology*, 116, 36-37
- Szczepanek T., Macadre C., Meunier B., Lazowska J., 1994. Two homologous introns from related *Saccharomyces* species differ in their mobility. *Gene*, 139, 1, 1-7
- Takino M., Yamaguchi K., Nakahara T., 2004. Determination of carbamate pesticide residues in vegetables and fruits by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 727-735
- Talaska G., and Roh J. H., 1992. P-postlabelling and mass spectrometric methods for analysis of bulky, polyaromatic carcinogen- DNA adducts in humans. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 580, 293-323.
- Teixidó N., Usall J., Magan N., Viñas I., 1999. Microbial population dynamics on golden delicious apples from bud to harvest and effect of fungicide applications. *Ann. Appl. Biol.*, 134, 109-116

- Thakker D. R., Yagi H., Levin W., Wood A. W., Conney A. H., Jerina D. M., 1985. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolic activation to ultimate carcinogens. In: Bioactivation of foreign compounds (Anders, M. W., ed.), 177-242, Academic Press, Orlando
- Thuriaux P., and Mosrin C., 1991. La génétique moléculaire des levures, in Biotechnologie des levures, Masson, Paris, 49-79
- Tian G. L., Macadre C., Kruszewska A., Szczesniak B., Ragnini A., Grisanti P., Rinaldi T., Palleschi C., Frontali L., Slonimski P. P., Lazowska J., 1991. Incipient mitochondrial evolution in yeasts. I. The physical map and gene order of *Saccharomyces douglasii* mitochondrial DNA discloses a translocation of a segment of 15,000 base-pairs and the presence of new introns in comparison with *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Molecular Biology, 218, 4, 735-746
- Tian G. L., Michel F., Macadre C., Slonimski P. P., Lazowska J., 1991. Incipient mitochondrial evolution in yeasts. II. The complete sequence of the gene coding for cytochrome *b* in *Saccharomyces douglasii* reveals the presence of both new and conserved introns and discloses major differences in the fixation of mutations in evolution. Journal of Molecular Biology, 218, 4, 747-760
- Tian G. L., Michel F., Macadre C., Lazowska J., 1993. Sequence of the mitochondrial gene encoding subunit I of cytochrome oxidase in *Saccharomyces douglasii*. Gene, 124, 2, 153-163
- Tijsterman M., Tasseront-de Jong J. G., van de Putte P., Brouwer J., 1996. Transcription-coupled and global genome repair in the *Saccharomyces cerevisiae* RPB2 gene at nucleotide resolution. Nucleic Acids Research, 24, 18, 3499-3506
- Torres E., Sandoval J. V., Resell F. I., Grant M. A., Vazquez-Duhalt R., 1995. Site-directed mutagenesis improves the biocatalytic activity of iso-1-cytochrome c in polycyclic hydrocarbon oxidation. Enzyme and Microbial Technology, 17, 1014-1020
- Trösken E. R., Bittner N., Völkel W., 2005. Quantitation of 13 azole fungicides in wine samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of chromatography, 1083, 1-2, 113 - 119
- Troxel C. M., Reddy A. P., O'Neal P. E., Hendricks J. D., Bailey G. S., 1997. *In Vivo* Aflatoxin B1 Metabolism and Hepatic DNA Adduction in Zebrafish (*Danio rerio*). Toxicology and applied pharmacology, 143, 213-220
- Tsakiris I. N., Toutoudaki M., Nikitovic D. P., Danis T. G., Stratis I. A., Tsatsakis A. M., 2002. Field study for degradation of methyl parathion in apples cultivated with integrated pest management system. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 69, 6, 771-778
- Ueda M., Kinoshita H., Yoshida T., Kamasawa N., Osumi M., Tanaka A., 2003. Effect of catalase-specific inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole on yeast peroxisomal catalase in vivo. FEMS Microbiology Letters, 219, 93-98
- Union Européenne, 2004. Pesticide residues, European commission, disponible sur <http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph-ps/pest/index-en.htm>

- Urban D. J., and Cook N. J., 1986. Standard evaluation procedure: ecological risk assessment. EPA 540/9-95-001. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C, 102 p.
- Valenzuela A. I., Pico Y., Font G., 2001. Determination of five pesticide residues in oranges by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography to estimate daily intake of consumers. J. AOAC int., 84, 901-909
- Vainio H., 1998. Use of biomarkers - new frontiers in occupational toxicology and epidemiology. Toxicology Letters, 102-103, 581-589
- Vainio H., 2001. Use of biomarkers in risk assessment. Int. J. Hyg. Environ. Health 204, 91-102
- Vanden Bossche H., 1988. Mode of action of pyridine, pyrimidine and azole antifungals. In Sterol Biosynthesis Inhibitors: Pharmaceutical and Agrochemical Aspects (D. Berg and M. Plempel, Eds.), 79-119. Horwood, Chichester, UK.
- Vanden Bossche H., 1990. Importance and role of sterols in fungal membranes. In *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi* (P. J. Kuhn, A. P. J. Trinci, M. J. Jung, M. W. Goosey, and L. G. Copping, Eds.), 135-158. Springer-Verlag, Berlin.
- Van den Brink H. J. M., van Nistelrooy H. J. G. M., de Waard M. A., van den Hondel C. A. M. J. J., van Gorcom R. F. M., 1996. Increased resistance to 14cc-demethylase inhibitors (DMIs) in *Aspergillus niger* by coexpression of the *Penicillium italicum* eburicol 14wdemethylase (*cyp51*) and the *A. niger* cytochrome P450 reductase (*cprA*) genes. Journal of Biotechnology, 49, 13-18
- Van den Brink H. J. M., Van Gorcom R. F. M., Van den Hondel C. A. M. J. J., Punt P. J., 1998. Cytochrome P450 Enzyme Systems in Fungi. Fungal Genetics and Biology, 23, 1-17
- Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., Smith H. O., Yandell M., Evans C. A., Holt R. A., *et al*, 2001. The sequence of the human genome. Science, 291, 1304-1351
- Vasserot Y., 1996. La fermentation alcoolique chez *Saccharomyces cerevisiae* : aspects biochimiques et physiologiques. Revue française d'œnologie, 159, 13-16
- Venturin C., Boze H., Fährasmane L., Moulin G., Galzy P., 1994. Influence de la concentration en glucose et en oxygène sur la capacité fermentaire de la souche *Hanseniaspora uvarum* K5. Sciences des aliments, 14, 321-333
- Verschueren, 2001. Handbook of environmental data on organic chemicals, John Wiley and Sons, New York, NY, 2416 p.
- Viviani-Nauer A., Hoffman-Boller P., Gafner J., 1997. In vitro degradation of phthalimide in aqueous solutions and in yeast suspensions. American Journal of enology and viticulture, 48, 1, 63-66
- Wang J. S., and Groopman J. D., 1999. DNA damage by mycotoxins. Mutation Research, 424, 167-181

- Wang X., Yin C., Wang L., 2002. Structure–activity relationships and response–surface analysis of nitroaromatics toxicity to the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Chemosphere*, 46, 1045-1051
- Watanabe-Akanuma M., Ohta T., Sasaki Y. F., 2005. A novel genotoxic aspect of thiabendazole as a photomutagen in bacteria and cultured human cells. *Toxicology Letters*, 158, 3, 213-219
- Watters B.S., and Sturgeon S.R., 1991. The toxicity of some fungicides to apple pollen cv. Jester. *Annals of applied biology*, 118, 72-73
- Weber-Lotfi F., Pfohl-Leszkowicz A., Keith G., Pillay D. T. N., Dietrich A., Rether B., Guillemaut P., 1992. Formation of abnormal hypermodified nucleotides on plant DNA upon xenobiotic action. *Plant science*, 86, 13-19
- Weber J. M., Reiser J., Käppeli O., 1990. Lanosterol 14 α -demethylase-encoding gene: systematic analysis of homologous overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* using strong yeast promoters. *Gene*, 87, 2, 167-175
- Welty C., Reissig W. H., Dennehy T. J., Weires R. W., 1989. Relationship between field efficacy and laboratory estimates of susceptibility to cyhexatin in populations of European red mite. *Journal of economic entomology*, 82, 2, 354-364
- Whysner J., Montandon F., McClain R. M., Downing J., Verna L. K., Steward 3rd R. E., Williams G. M., 1998. Absence of DNA Adduct Formation by Phenobarbital, Polychlorinated Biphenyls, and Chlordane in Mouse Liver Using the 32P-Postlabeling Assay. *Toxicology and applied pharmacology*, 148, 14-23
- Winter M. J., Day N., Hayes R. A., Taylor E. W., Butler P. J., Chipman J. K., 2004. DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. *Mutation Research*, 552, 163-175
- Wogan G. N., Hecht S. S., Felton J. S., Conney A. H., Loeb L. A., 2004. Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14, 473-486
- Wright R. M., Simpson S. L., Lanoil B. D., 1995. pH and the cAMP-dependant protein kinase mediate growth phase induction of the cytochrome c oxidase subunit VI gene, COX6, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications*, 214, 3, 1051-1059
- Wu Y. S., Lee H. K., Li S. F. Y., 2001. High-performance chiral separation of fourteen triazole fungicides by sulfated b-cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 912, 171-179
- Yabusaki Y., 1995. Artificial P450/reductase fusion enzymes: What can we learn from their structures? *Biochemie*, 77, 594-603
- Yamaguchi Y., and Kuo M. T., 1995. Functional analysis of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator interactions with aryl hydrocarbon receptor in the yeast two-hybrid system. *Biochemical Pharmacology*, 50, 8, 1295-1302

- Yang K., Airolidi L., Pastorelli R., Restano J., Guanci M., Hemminki K., 1996. Aromatic DNA adducts in lymphocytes of humans working at high and low traffic density areas. *Chemico-Biological Interactions*, 101, 127-136
- Yang W. L., Cvijic M. E., Ishii K., Chin K. V., 1998. The Requirement of Yeast Ssl2 (Rad25) for the Repair of Cisplatin-Damaged DNA. *Biochemical and biophysical research communications*, 250, 593-597
- Ye F., Xie Z., Wu X., Lin X., 2006. Determination of pyrethroid pesticide residues in vegetables by pressurized capillary electrochromatography. *Talanta*, 69, 97-102
- Young M. S., Early M. F., Mallet C. R., Krol J., 2001. Application of a mixed-mode solid- phase extraction and cleanup procedure for LC/MS determination of thiabendazole and carbendazime in apple juice. *Journal of AOAC international*, 84, 5, 1608-1613
- Zambonin C. G., Cilenti A., Palmisano F., 2002. Solid phase microextraction and gaz chromatography-mass spectrometry for the rapid screening of triazole residues in wine and strawberries. *Journal of chromatography A*, 967, 255-260
- Zabik M. J., El Hadidi M. F. A., Cash J. N., Zabik M. E., Jones A. L., 2000. Reduction of azinphos-méthyl, chlorpyrifos, esfenvalerate and methomyl residues in processed apples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 4199-4203
- Zaripov S. A., Naumov A.V., Abdrakhmanova J. F., Garusov A. V., Naumova R. P., 2002. Models of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) initial conversion by yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 217, 213-217